



Instituto de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ingeniería genética Vegetal

TÍTULO

“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

Talca, marzo de 2018

Director: Dr. Raúl Simón Herrera Faúndez

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1. Formulación del marco teórico	12
2. Antecedentes bibliográficos	14
2.1. El fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> L. Duch.	14
2.2. Ensamblaje y desensamblaje de la pared celular vegetal.	16
2.3. Concepto de maduración frutal.	17
2.4. Factores de Transcripción del tipo NAC.	18
3. Planteamiento del problema	21
4. Formulación de hipótesis	22
5. Objetivos generales y específicos	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos específicos	22

CAPITULO 1

Caracterización de un cDNA que codifica para un factor de transcripción de la familia NAC (*FcNAC1*) expresado en frutos de *Fragaria chiloensis*.

1. Introducción	24
2. Materiales y métodos	26
2.1. Material vegetal.	26
2.1.1. Extracción de RNA.	26
2.1.2. Síntesis de cDNA.	28
2.2. Obtención del cDNA de largo completo de FcNAC1.	28
2.2.1 Diseño de partidores para RACE.	28
2.2.2 Generación del cDNA para RACE.	29

2.2.3 PCR RACE.	30
2.2.4 Clonamiento y secuenciación de productos de RACE y Clonamiento del cDNA de largo completo FcNAC1.	30
2.3. Alineamiento múltiple y análisis filogenético.	32
2.4. Modelamiento por homología y refinamiento por dinámica molecular.	32
2.5. Expresión transiente en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y localización sub-celular de FcNAC1.	33
2.6. Análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR.	35
2.7 Ensayo funcional de transactivación transcripcional mediante técnica de luciferasa dual.	37
2.8 Análisis estadísticos.	38
3. Resultados y discusión	
3.1. Obtención de la secuencia de largo completo del factor de transcripción FcNAC1.	39
3.2. Análisis filogenético.	43
3.3. Análisis de expresión del gen <i>FcNAC1</i> en frutos y tejidos vegetativos.	46
3.4. Clonamiento de <i>FcNAC1</i> y su localización subcelular en hojas de tabaco.	48
3.5. Análisis funcional <i>in-planta</i> del gen <i>FcNAC1</i> mediante transactivación transcripcional.	50
3.6. Modelamiento estructural del dominio NAC presente en el factor de transcripción FcNAC1.	53
4. Conclusiones	60

CAPITULO 2

Estudio de la modulación de la expresión génica del gen *FcNAC1* mediante tratamientos hormonales en fruto de *Fragaria chiloensis* y análisis *in-silico* de su secuencia promotora

1. Introducción	62
2. Materiales y métodos	64

2.1. Material vegetal.	64
2.2. Tratamientos Hormonales.	64
2.2.1 ABA.	64
2.2.2 Auxina.	65
2.3. Extracción de DNA genómico.	65
2.4. Obtención de la secuencia promotora del gen FcNAC1.	66
2.5. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.	67
2.6. Análisis de la expresión génica del gen FcNAC1 de frutos con tratamientos hormonales por qRT-PCR.	68
2.7. Análisis estadísticos.	69
3. Resultados y discusión	
3.1. Obtención de la secuencia promotora del gen <i>FcNAC1</i> y análisis <i>in-silico</i> de sus elementos en cis relacionados a respuestas hormonales y respuesta a miembros de la familia NAC.	70
3.2. Análisis de expresión del gen <i>FcNAC1</i> en frutos tratados con fitohormonas	76
4. Conclusiones	79

CAPITULO 3

Caracterización y clonamiento de un cDNA que codifica para otro miembro de la familia NAC (*FcNAC2*) y su potencial interacción con *FcNAC1* mediante ensayos funcionales de luciferasa dual.

1. Introducción	81
2. Materiales y métodos	83
2.1. Obtención del Material vegetal.	83
2.2. Extracción de RNA.	83
2.3. Clonamiento del gen <i>FcNAC2</i> , alineamiento múltiple y análisis filogenético.	84
2.4. Análisis de la expresión génica.	86

2.5. Ensayo funcional de transactivación transcripcional mediante técnica de luciferasa dual.	87
2.6. Análisis estadístico.	88
3. Resultados y discusión	
3.1. Obtención de la secuencia de largo completo del factor de transcripción FcNAC2.	89
3.2. Análisis filogenético.	94
3.3. Análisis de expresión del gen <i>FcNAC2</i> en frutos y tejidos vegetativos.	96
3.4. Análisis funcional <i>in-planta</i> del gen <i>FcNAC2</i> mediante transactivación transcripcional y su potencial interacción con <i>FcNAC1</i> .	98
4. Conclusiones	103
CONCLUSIONES GENERALES	104
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	109
ANEXO	121
1. Material suplementario	
Characterization of <i>FcNAC1</i> : A novel transcription factor from <i>Fragaria chiloensis</i> fruit.	122
2. Figuras suplementarias	
Figura suplementaria 1	162
Figura suplementaria 2	162
Figura suplementaria 3	163
Figura suplementaria 4	163
2. Abreviaturas	124

RESUMEN

Fragaria chiloensis es una rosacea 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.

ABSTRACT

Fragaria chiloensis is a one endemic rosacea from Chile, which produces a fruit with interesting characteristics such as an attractive taste, pleasant aroma, disease resistance. This specie has been proposed as an agronomic resource for exportation, together with the economic interest which generates. However, this fruit show a limited post-harvest period and a fast softening process. This fact has generated a displacement of the *F. chiloensis* fruit by other cultivars such as the commercial strawberry (*F. x ananassa*) from North America, which presents more firmness after ripening. As the national and international market has increased its demand for more attractive and exotic fruits, *F. chiloensis* has become a new alternative for export our country and has emerged as a model for studies associated to ripening and softening of fruits. The fruit maturity is circumscribed in a synergic process such physiological and biochemical at development stages. The fruit madurity in *Fragaria* species, which are non-climacteric fruits, are regulated by the participation of various molecular factors, including transcription factors, which are family proteins that coordinate and regulate the expression of a gene or group of genes, and in many cases, regulate their own expression. The transcription factors of the NAC family (NAM, ATAF1,2 and CUC2) are plant-specific and perform different functions promoting the transcriptional regulation of various types of genes, including some described that are directly related to physiological modifications and changes in cell walls. This changes occur during fruit maturation and alter enzymes such as, Polygalacturonases, Pectatolyases, Endoglucanases, Expansines, Xyloglucan Endotransglycosilases/hydrolases, among others, which have in their promoter zones *cis* elements that are recognized by transcription factors of the NAC family.

The role in the maturation and softening process of NAC transcription factors family in Chilean strawberry is, to date, unknown. This fact arises the need to carry out more studies in order to understand this process. For this reason, the objective of this doctoral thesis was to identify, clone and characterize a NAC from *F. chiloensis* (FcNAC1), which presented a cDNA sequence of 999 bp, that encodes a protein of 332 amino acids and present the conserved domain of the NAC family in its amino terminal. Phylogenetic

analyses were performed with members of this family with known function and it was possible to appreciate that FcNAC1 presents an evolutionary closeness with SND2 (SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 2), which is involved in cell wall remodeling. Through trans-transformation of tobacco leaves by agroinfiltration, it was possible to determine the subcellular location of our transcription factor evidenced that is found in the nucleus. The variation in FcNAC1 expression during fruit development and maturation was also determined, where it was possible to see that the transcript levels increase concomitant to the maturation and fruit development process, in addition it was possible to appreciate that the transcriptional profile in vegetative tissues presented a greater accumulation of these in flowers, previous to the fruit formation step, albeit, not accumulation of transcript was observed in other tissues as roots, stolons, leaves and stems. Using Genome-walker technique, it was possible to obtain a 1488 bp fragment concerning to *FcNAC1* promoter sequence and through *in-silico* analysis it was possible to evidence putative *cis* elements in response to hormonal signals and also the recognition sites for the NAC family called SNBEs (Secondary wall NAC binding elements). In order to understand the hormonal transcription regulation of *FcNAC1*, hormonal treatments in fruits were carried out, where it was possible to see that there is a positive regulator effect by abscisic acid and a negative regulation by auxins (IAA). In order to investigate the structural conformation of FcNAC1 and making use of bioinformatic tools, the three-dimensional protein structure was obtained, its homodimer conformation, its DNA recognition interaction and important residues that allow the stabilization of this interaction is described. A transcriptional transactivation was performed by dual luciferase assay, where it was possible to appreciate that FcNAC1 has transcriptional activity against a promoter sequence of a gene related to cell wall remodeling, which allows us to suggest that FcNAC1 would be involved in the cell wall remodeling process, concomitant event with the fall of firmness of *F. chiloensis* fruits. In addition, another member of this family which we named *FcNAC2* was identified, composed of 1038 bp cDNA that encodes a protein of 346 amino acids and also presenting the conserved NAC domain in its amino terminal zone. When phylogenetic analyzes was performed, it was possible to see that FcNAC2 presents evolutionary closeness with AtNAC2 (NAC-REGULATED SEED MOPHOLOGY 1, NARS1), which describes that it could be involved in the incorporation

of environmental and endogenous stimuli in the lateral root development process. The relative expression of *FcNAC2* in fruit and in vegetative tissues was evaluated, where it was possible to appreciate that transcript levels increase as the fruit development and maturation process progresses and presenting a high transcripts level in roots, stems and stolons. Finally, dual luciferase assays suggest that FcNAC1 and FcNAC2 could be interacting together promoting the expression of genes related to cell wall remodeling.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO

La frutilla chilena blanca (*Fragaria chiloensis* (L.) (Duch)) es una especie endémica de Chile, la cual presenta atributos comerciales de interés económico como un agradable sabor y aroma, ésta además es reconocida por un calibre de fruto grande, alta tasa fotosintética y alta resistencia a enfermedades. El fruto se perfila como un potencial producto agronómico de exportación, pudiendo generar beneficios tanto sociales como económicos para nuestro país, ya que presenta características nutricionales y organolépticas remarcables como su agradable sabor, intenso aroma y el distintivo color rosado pálido de su fruto en estadio maduro. Este último atributo perfila al fruto de *F. chiloensis* como un promisorio candidato a una comercialización como un Berry exótico.

Con el objetivo de poder alzar el posicionamiento a la frutilla chilena blanca dentro de mercados tanto nacionales como internacionales, surge la necesidad de generar conocimiento en temáticas relacionadas a aspectos agronómicos de su producción, estudios económicos y su potencial comercialización. Además, es de vital importancia generar conocimiento entorno a los procesos moleculares, fisiológicos del desarrollo y pos cosecha del fruto, debido a que éste no está exento de problemas como, por ejemplo, el bajo rendimiento que se obtiene por temporada, periodo reproductivo de corta duración y el acelerado proceso del ablandamiento de estos frutos.

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 culmines del desarrollo de este. La maduración de los frutos de especies de *Fragaria*, sobre los cuales se describe que son 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 de expresión para diversos tipos genes, como algunos que presentan directa relación con modificaciones fisiológicas y cambios en la pared celular ocurridas durante la maduración de frutos. Entre esos genes se encuentran, por ejemplo: *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 objetivo central de esta tesis doctoral fue caracterizar el factor de transcripción *FcNAC1*, para lo cual se obtuvo la secuencia de largo completo que codifica para esta proteína, se realizaron análisis de secuencias y ensayos filogenéticos. Con la finalidad de generar información a nivel molecular, se realizó la localización sub-celular de *FcNAC1* y mediante el uso de herramientas bioinformáticas, fue posible describir su estructura monomérica y homodimérica a nivel atómico-estructural y su interacción con DNA. Se realizaron cuantificaciones de los niveles de transcritos presentes tanto en distintos estadios de maduración del fruto y en tejidos vegetativos de la planta. Fue posible también obtener parte del promotor del gen *FcNAC1* y se realizó el análisis *in-silico* de los elementos de respuesta a señales hormonales y de reconocimiento por miembros de la familia NAC, a su vez, se realizó ensayos de tratamientos hormonales en fruto para ver la respuesta transcripcional del gen frente a estos estímulos. Además, se llevó a cabo ensayos funcionales en planta, con la finalidad de poder dilucidar la potencial función que podría estar realizando este gen en el fruto. Finalmente, fue posible describir otro miembro de esta familia, *FcNAC2*, del cual reportamos su secuencia, análisis filogenéticos, sus perfiles de expresiones relativos en los distintos estadios de maduración del fruto y en tejidos vegetativos y ensayos funcionales en plantas de tabaco, con la finalidad de evaluar si estos

miembros son capaces de interactuar promoviendo la expresión de genes relacionados a la remodelación de la pared celular.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1. El fruto de *F. chilensis* L. Duch.

La frutilla silvestre, *F. chilensis* L. Duch., también denominada frutilla de la costa de Chiloé, es una especie nativa de Chile, la cual se encuentra distribuida desde el círculo ártico en el oeste de Norte América hasta el extremo más austral de Chile y Argentina (Bringhurst y cols., 1990). Esta se caracteriza por su atractiva y llamativa apariencia fenotípica (Fig. 1), al igual que por sus atributos fisiológicos, entre los cuales se puede mencionar su agradable sabor, fina textura y placentero aroma, sumado a su elevado valor nutricional dado por el alto contenido de minerales, vitaminas y antioxidantes que este Berry presenta (Qin y cols., 2008). Es por estos aspectos, que este fruto ha adquirido un elevado valor económico, el cual ha sido de interés para la agroindustria (Hancock y cols., 1999). El fruto generado por *F. chilensis* presenta características de ser un fruto de tipo no climatérico, poliploide ($2n=8x=56$), el cual en su estadio maduro presenta una llamativa coloración rosada pálida de su receptáculo y aquenios de color rojo. Esta es una especie nativa de Chile y ha sido, por años, cultivada por etnias endógenas de varias partes de nuestro territorio nacional.



Figura 1. Fruto de *F. chiloensis ssp. chiloensis* (conocido como quellghen por las etnias mapuches) en su estadio maduro, donde es posible apreciar su llamativa coloración rosada pálida de su receptáculo y en color rojo se aprecian los achenios embebidos en el receptáculo.

El fruto de *F. chiloensis* perfila variados atributos que lo proyectan como un recurso agronómico llamativo, pero presenta algunos problemas en el rendimiento de sus periodos de cosecha, ello debido a que la cantidad de frutos que se obtienen por temporada es variable, y conjunto con esto, exhibe un corto periodo reproductivo durante la temporada y una rápida maduración, lo cual es concomitante con un acelerado proceso de ablandamiento temprano de los frutos (Retamales y cols., 2005). Esto se manifiesta en una rápida pérdida de firmeza, la cual inicia incluso antes de que la fruta éste completamente madura (Figuroa y cols., 2009; Opazo y cols., 2010). Es por esto, que los cultivos nativos de Chile no han sido utilizados extensivamente y por el contrario la incorporación de cultivares extranjeros y nuevos cultivares de la frutilla comercial (*F. x ananassa*) han sido los seleccionados. Adicionalmente, es posible apreciar una situación crítica para esta especie nativa, sumando al acelerado avance de las construcciones urbanas, con la consecuente disrupción de los hábitats naturales (Lavin y cols., 2000).

Debido al aumento en la demanda de frutos exóticos por parte del mercado tanto nacional como internacional, el fruto de *F. chiloensis* ha tomado lugar como una alternativa de exportación para Chile y ha ganado terreno como especie modelo de estudios relacionados a eventos tanto moleculares como fisiológicos asociados a la maduración de frutos no-climatéricos (Nishizawai y cols., 2002; Figuroa y cols., 2009).

2.2. Ensamblaje y desensamblaje de la pared celular vegetal.

Las paredes celulares que rodean las células vegetales son estructuras complejas y dinámicas, compuestas principalmente por polisacáridos de alto peso molecular, proteínas altamente glicosiladas y, en algunos casos, lignina (Somerville y col., 2004). Poseen la capacidad de determinar la forma celular, otorgar estabilidad mecánica, mantener unidas las células en un tejido, modular el crecimiento celular y constituir una barrera ante el ataque de patógenos. Tanto la estructura, composición y propiedades de la pared celular cambian a lo largo de la vida de la célula. Las nuevas paredes celulares, denominadas primarias, son generadas durante la división celular y rápidamente aumentan su área superficial cuando ocurre la expansión celular. La pared celular primaria (PCP), que es la que se halla en los frutos, posee un escaso o nulo contenido de compuestos fenólicos y, a diferencia de las paredes secundarias, está altamente hidratada (65% de agua). Dicho componente acuoso contiene solutos y proteínas solubles, que incluyen enzimas relacionadas al ensamblaje y desensamblaje de la pared celular (Brummell, 2006). Estos componentes son pilares claves para la modulación del correcto desarrollo y mantención de las especies vegetales. Tres son los principales componentes polisacáridos: celulosas, pectinas y hemicelulosa. La celulosa está formada por una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4, siendo el polisacárido más abundante. Las pectinas son polisacáridos compuestos principalmente por ácido galacturónico, como ramnogalacturonano del tipo I y II y ácido poligalacturónico. Por último, están las hemicelulosas que principalmente son moléculas neutras, y entre ellas podemos evidenciar los xiloglucanos que son las hemicelulosas más estudiadas y los xilanos.

La pérdida de la fuerza mecánica de los frutos durante la maduración se debe a cambios en las concentraciones iónicas que sufre la pared celular, lo que se traduce en modificaciones fisicoquímicas de la pared (Carpita y Gibeaut, 1993). Este cambio genera alteraciones en la estructura y composición de los componentes de la pared debido a la acción coordinada de enzimas que promueven el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular, tales como Poligalacturonasa (PG), Pectinmetilesterasa (PME), β -Galactosidasa (β -

Gal), Endoglucanasas (EGasa), Expansinas (Exp), Xiloglucano Endotransglicosilasa/Hidrolasa (XET/H), entre otras (Brummell y Harpster, 2001).

2.3. Concepto de maduración frutal.

Entendemos como maduración a la sumatoria de los cambios tanto fisiológicos como bioquímicos que experimenta un fruto en los últimos estadios de desarrollo, lo cual genera que un fruto adquiera los atributos y condiciones para ser atractivo hacia el consumidor. Estas modificaciones, en especies de *fragaria* como el caso de *fragaria x ananassa* reportado por Symons y cols. 2012, estarían relacionadas a cambios hormonales durante el desarrollo del fruto donde se evidencia que ácido abscísico presentaría un rol importante aumentando sus niveles a medida que transcurre el desarrollo del fruto. Todas las especies presentan diversos fenómenos relacionados a la maduración, pero contienen puntos en común, los cuales son las modificaciones en la estructura de la pared celular afectando la textura de los frutos y el incremento en la susceptibilidad a patógenos durante el periodo de pos cosecha, modificaciones en los niveles de pigmentación, contenido de azúcares, aroma, entre otros (Figueroa y cols. 2010).

El ensamblaje y desensamblaje de la pared celular es una de las características más influyente durante la maduración, debido a que este fenómeno se traduce en el ablandamiento de un fruto, condición que se acrecienta durante el tiempo de almacenamiento.

Para la frutilla chilena blanca se han descritos 4 estadios de desarrollo y maduración: estadio C1 (verde pequeño), que se caracteriza por ser un fruto pequeño de receptáculo verde y achenios del mismo color; estadio C2 (verde maduro), fruto grande con el receptáculo de color verde y achenios rojos; C3 (transición), fruto con receptáculo de color blanco y achenios de color rojo; por último, estadio C4 (maduro), caracterizado por fruto de receptáculo de color rosado y los achenios de color rojo. Además, se ha demostrado que enzimas remodeladoras de la pared (como Poligalacturonasas y Pectatoliasas) presentan

alzas en sus niveles de transcritos conforme avanza el proceso de maduración de los frutos en *F. chiloensis*, y a su vez, se aprecia un descenso en la firmeza (Figuroa y cols. 2008). El alza en los niveles de transcritos de enzimas remodeladoras de pared celular sería el resultado de la acción de diversos factores de transcripción que promueven la expresión de estos genes, entre los que se encuentran los factores de transcripción de la familia NAC.

2.4. Factores de Transcripción del tipo NAC.

Podemos definir brevemente que los factores de transcripción son familias de proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos, regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Además, pueden interactuar con zonas específicas del DNA (regiones en *cis*), con elementos de la maquinaria transcripcional como RNA polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad, y en algunos casos, sus expresiones son espacio-temporal. Desde este punto, nos referiremos específicamente a los factores de transcripción de la familia NAC. Estos factores de transcripción son específicos y abundantes del reino de las plantas y su nombre fue asignado por los primeros factores de esta familia en ser caracterizados (NAC = NAM, ATAF1,2 y CUC2), alcanzando un número no menor de 135 miembros en *A. Thaliana* (Riechmann y cols., 2000). La función biológica en vegetales que presentan estos primeros miembros descritos de esta familia es similar, y tienen relación con la formación del SAM (meristema apical del tallo) y en la separación de los cotiledones en las etapas tempranas de desarrollo. Es más, estudios en plantas mutantes recesivas de estos genes (*nam*, *cuc1* y *cuc2*), ya sea por separado o en conjunto, presentan fenotipos similares no generando la formación del SAM y produciendo cotiledones fusionados (Souer y cols., 1996; Aida y cols., 1997). Por otro lado, se ha descrito que esta familia génica interactúa con varias rutas a la vez, ya que al sobre-expresar miembros de esta familia, las plantas mejoran sus respuestas al estrés por: heridas, shock por frío, deshidratación, sequía, entre otros. (Collinge y cols., 2001; Hegedus y cols., 2003; Tran y cols., 2004). Además, se ha descrito que genes NAC están también implicados en respuestas a luz, muerte celular programada y

senescencia, entre otras (John y cols., 1997; Lin y cols., 2004).

En lo que respecta a la estructura de las proteínas codificadas por estos genes, se ha descrito que presentan en su región N-terminal un dominio altamente conservado, el dominio NAC, el cual interactúa con DNA (Aida y cols., 1997) y los componentes del extremo C-terminal son altamente divergentes no conteniendo ningún dominio proteico conocido, pero en varios miembros de esta familia actúan como activadores transcripcionales (Ooka y cols., 2003). Además, se ha descrito mediante difracción de rayos X, la estructura de este tipo de factores de transcripción, lo que da cuenta de la presencia de una pequeña agrupación de sabanas β antiparalelas torcidas compactadas por una α hélice en un lado y una corta hélice por el otro, además, el dominio NAC posee una zona rica en residuos con carga positiva, los cuales estarían envueltos en la interacción con el DNA, tanto como homo y heterodimeros (Ernst y cols., 2004).

Se ha descrito en especies modelos como *Arabidopsis thaliana*, que miembros de factores de transcripción de la familia NAC son capaces de regular la expresión de genes relacionados a distintos tipos de estrés, como también genes involucrados con el desarrollo de pared celular, en plántulas que sobre-expresan un miembro de esta familia (*SND2*) (Hussey y cols., 2011).

Existen a la fecha pocos reportes de factores de transcripción de la familia NAC relacionados con el proceso de desarrollo y maduración de frutos, donde se ha caracterizado en *Solanum lycopersicum* una proteína con dominio NAC, llamado SINAC4, el cual muestra una alta acumulación en sépalos y actuaría en los inicios de la maduración del fruto (Zhu y cols., 2014). En ensayos de RNAi se muestra un retardo en el proceso de maduración, supresión de Chl, reducción de los niveles de transcritos de los genes de la vía de biosíntesis de etileno, reducción del contenido de carotenoides, entre otros. También se ha reportado en *Musa acuminata* la caracterización de seis genes NAC (MaNAC1-MaNAC6), determinándose que estos genes presentan perfiles de expresión génica diferenciales en piel y pulpa, siendo MaNAC1 y MaNAC2 actores directos de la maduración del fruto vía interacción con la ruta biosintética de señalización de etileno

(Shan y cols., 2012).

Por otro lado, Pimentel y cols. han reportado (2010), librerías supresivas sustractivas (SSHs) de distintos estadios de maduración del fruto de *F. chiloensis*, y mediante herramientas bioinformáticas fue posible encontrar gran parte de un transcrito que codifica para un factor de transcripción del tipo NAC. Este gen está presente en el estadio C2 de maduración del fruto, paso previo a la drástica pérdida en la firmeza en el estadio C3, como reporta Figueroa y cols. (2008). Ello podría indicar alguna relación de regulación de genes que participan muy tempranamente del proceso de remodelación de la pared celular y, por ende, estar relacionado a eventos involucrados con el ablandamiento de los frutos durante la maduración.

3. Planteamiento del problema.

Uno de los factores mas importantes en relación a la calidad de un fruto para su comercialización es su firmeza, atributo que es buscado por el consumidor. En los frutos de frutilla chilena blanca se describe un rápido proceso de ablandamiento, lo cual genera una reducción en la vida post-cosecha y potencial comercialización de este interesante y llamativo Berry. Además, se ha descrito que existe una concomitancia entre la pérdida de firmeza del fruto y las modificaciones en la composición de la pared celular, donde los responsables de estas modificaciones son enzimas y proteínas que están involucradas en coordinar el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular. Como se desconoce el rol de miembros de la familia NAC durante el proceso de maduración y ablandamiento en *F. chiloensis*, se propone en esta tesis doctoral realizar la caracterización del gen *FcNAC1*, donde se evaluarán sus niveles de expresión relativa, su localización sub-celular, análisis de su estructura tridimensional a nivel atómico, su expresión ante señales hormonales en fruto, análisis de su secuencia promotora y análisis funcional en planta. Además, se describirá *FcNAC2*, del cual describiremos el análisis de su secuencia, niveles de expresión y análisis funcionales.

4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

“El factor de transcripción de la familia NAC (*FcNAC1*), expresado diferencialmente en frutos de *F. chiloensis* L. (Duch.), promueve la transcripción de genes relacionados con el proceso de ensamblaje y desensamblaje de la pared celular, presentando así participación en el proceso de ablandamiento de los frutos de esta especie”.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

5.1 Objetivo general

Realizar la caracterización del factor de transcripción *FcNAC1* expresado diferencialmente durante el proceso de desarrollo y maduración de los frutos de frutilla chilena blanca y analizar el efecto regulador que este posee sobre genes involucrados en el ablandamiento del fruto de *F. chiloensis*.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar estructuralmente y determinar los niveles de expresión del gen *FcNAC1* durante el proceso de maduración de la frutilla chilena blanca y en tejidos vegetativos.
2. Evaluar la modulación transcripcional del gen *FcNAC1* en frutos tratados con hormonas relacionadas al proceso de maduración y ablandamiento de frutos.
3. Evaluar el potencial rol como regulador transcripcional del factor de transcripción *FcNAC1* a través de análisis funcionales *in-planta*.

CAPÍTULO 1

Caracterización de un cDNA que codifica para un factor de transcripción de la familia NAC (*FcNAC1*) expresado en frutos de *F. chiloensis*.

1. INTRODUCCIÓN

La frutilla chilena nativa es una especie que ha sido utilizada como comida y bebida relacionada a ritos ceremoniales por gente nativa de Chile, por varios centenarios. Ecotipos de la especie pueden ser encontrados en diversos tipos de suelos y variables condiciones climáticas. Actualmente, estos frutos han sido considerados como una alternativa comercial llamativa debido a las interesantes características organolépticas que presentan (Retamales y cols., 2005). Cabe mencionar también que la especie *F. chiloensis* contribuye en gran medida en el historial genético de *Fragaria x ananassa*, siendo de este último el progenitor materno.

Se describe ampliamente en la literatura que la maduración frutal implica variados y complejos procesos en distintos niveles, tanto fisiológicos como bioquímicos, los cuales son acrecentados a medida que transcurre el proceso de maduración frutal. Bajo esta perspectiva, es sabido que un aspecto importante durante el proceso de maduración del fruto de *F. chiloensis* es la presencia de un marcado proceso de ablandamiento en el periodo de pos cosecha (Opazo y cols., 2010), lo cual es perjudicial para el transporte y comercialización de este recurso agronómico nativo. Uno de los factores mayormente incidentes en el proceso de ablandamiento frutal son las diversas modificaciones en la composición y estructura de la pared celular, lo cual ha sido ampliamente vinculado con alteraciones en las características de los polisacáridos presentes en esta compleja y dinámica matriz, como su solubilidad, uniones entre polímeros, tamaño, etc. (Brummell y Harpster, 2001; Vicente y cols., 2007). A su vez, modificaciones observadas en la composición y estructuras de pectinas, hemicelulosas y celulosas se encuentran principalmente coordinadas por la acción orquestada de variados tipos de enzimas, las cuales son destinadas a cumplir sus funciones en la pared celular (Brummell y Harpster, 2001). La regulación de la expresión de esta batería enzimática encargada de modular el proceso de ensamblaje y desensamblaje de la pared celular se encuentra regulada por distintos factores moleculares, entre ellos, factores de transcripción.

Los factores de transcripción NAC, es una de las más amplias familias génicas específicas de plantas y sus miembros han sido envueltos en diversos procesos biológicos, incluyendo desarrollo, división celular, respuestas a estrés bióticos y abióticos, formación de pared celular, entre otros (Podzimska-Sroka y cols., 2015). Referente a este último punto, se han realizado diversos estudios, en sistemas modelos, donde se ha podido identificar reguladores transcripcionales pertenecientes a esta familia génica relacionados a la biosíntesis de pared celular (Nakano y cols., 2015). Ejemplos de ello, podemos mencionar el trabajo realizado por Kubo y cols., (2005) donde haciendo uso de sistemas de cultivos celulares *in vitro* fue posible identificar a los factores de transcripción VND1-7 (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN1-7) como reguladores maestros de la diferenciación celular en viselos del xilema. A su vez, Mitsuda y cols., (2005) reportaron a NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST1) y NST2, como miembros de un grupo hermano a VNDs, regulando la formación de pared celular en células de anteras. Un subsecuente trabajo identificó que NST1 y NST3 (también nombrado en la literatura como SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN1 [SND1]), estarían funcionando como reguladores maestros de la diferenciación celular de fibras en *Arabidopsis* (Zhong y cols., 2006; Mitsuda y cols., 2007). Estos hallazgos, de cierto modo, revelan la regulación de la biosíntesis de pared celular a nivel molecular, dejando en claro que las plantas tienen reguladores transcripcionales específicos que modulan tanto la biosíntesis de la pared celular, como también su remodelación, permitiendo así que esta compleja matriz sea dinámica a través del tiempo.

El proceso de ablandamiento frutal en la especie *F. chiloensis* es un fenómeno complejo, donde se ha descrito que actúan de forma concertada, estímulo y tiempo dependiente, diferentes enzimas (entre las que podemos mencionar: Poligalacturonasa (PG), Pectinmetilesterasa (PME), β -Galactosidasa (β -Gal), Endoglucanasas (EGasa), Expansinas (Exp), Xiloglucano Endotransglicosilasa/Hidrolasa (XET/H), entre otras) que modulan el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular, pero se desconoce información sobre la regulación que podrían estar realizando factores de transcripción de la familia NAC durante este llamativo evento en esta especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal.

Frutos de frutilla chilena blanca de diferentes estadios de desarrollo (C1, C2, C3 y C4) y tejidos correspondientes a diferentes órganos (flores, raíces, hojas, estolones y tallos) fueron colectados desde diferentes plantas crecidas en un campo comercial en la ciudad de Contulmo, región del Biobío, Chile (latitud 38°04'8.6''S, longitud 73°14'2.96''W). Posterior a esto, se procedió a realizar la clasificación en cuatro diferentes estadios de desarrollo en función a su peso, color del receptáculo y aquenios, como ha sido previamente descrito en nuestro grupo de laboratorio: C1, fruto pequeño con receptáculo verde y aquenios del mismo color; C2, fruto largo con receptáculo de coloración verde y aquenios de color rojo; C3, estado de transición, con receptáculo de color blanco y aquenios de coloración roja; y C4, fruto maduro con receptáculo de coloración rosada pálida y aquenios de color rojo (Figueroa y cols., 2008). Posterior a la cosecha y clasificación, el pedúnculo y cáliz de cada fruto fue cuidadosamente removido y estos fueron cortados de forma longitudinal en dos mitades, congelados con nitrógeno líquido y almacenados en freezer a -80° C para su posterior uso.

2.1.1 Extracción de RNA.

Con la finalidad de poder obtener estimaciones estadísticamente significativas relacionadas a la expresión relativa de nuestro gen de interés, se procedió a realizar tres extracciones independientes de RNA total, considerando los distintos estadios de desarrollo de fruto (C1, C2, C3 y C4), además se obtuvieron muestras de RNA de raíces, hojas, estolones y flores de frutilla nativa chilena, lo cual fue llevado a cabo utilizando la metodología CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) con modificaciones menores descrita por Chang y cols. 1993. El paso inicial de este proceso de extracción de ácidos nucleicos consistió en la pulverizando de 2 g de tejido congelado por medio de Nitrógeno líquido en mortero frío. Luego, el material molido fue dispuesto en un tubo falcon de

polipropileno de 50 ml, el cual contenía 20 ml de una mezcla a 65 °C compuesta por tampón de extracción de RNA (2% (p/v) PVP; 100 mM Tris HCL (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl) mas 2% (v/v) β-mercaptoetanol. Posteriormente, se procedió a realizar una incubación por 15 min a 65 °C mezclando por inversión vigorosa cada 5 min, luego de esta incubación, se agregó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclando vigorosamente por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm por 25 min a 4 °C. Mediante micropipeteo, se recolectó el sobrenadante de la fase superior y se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó a 13000 rpm por 25 min a 4 °C. Se recolectó nuevamente el sobrenadante y se agregó ¼ de volumen de LiCl 10 M, mezclando gentilmente por inversión para generar una buena homogenización. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se procedió a realizar la centrifugación del material precipitado durante la noche a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. El pellet se resuspendió con 500 µl de tampón SSTE previamente calentado a 65 °C (1 M NaCl; 10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)), mediante agitación suave. Al sobrenadante se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12000 rpm por 30 min. Se rescató el sobrenadante y se agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente mantenido a -20 °C, y se incubó a -80 °C por 30 min. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet resultante fue resuspendido en 30 µl de agua bidestilada ultra pura. Para poder limpiar las muestras de trazas de DNA genómico, se procedió a tratar las muestras con DNAsa I (Fermentas) de frutos de todos los estadios de maduración y las muestras de tejido vegetativo. Para realizar este procedimiento, se trató 30 µl de muestra de RNA con 1 µl DNAsa I (1 U/ µl) mas 10 µl tampón 10X y agua bidestilada ultrapura para completar un volumen de 100 µl. Se incubó por 30 min a 37 °C y luego se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min. Se rescató el sobrenadante y se agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente mantenido a -20 °C, y se incubó a -20 °C por 2 h. Finalmente, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet resultante fue secado a 37° C y se resuspendió en 30 µL de agua bidestilada ultra pura.

La integridad del RNA se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE (5,7% (v/v) ácido acético; 2 M Tris HCl; 100 mM EDTA (pH 8,0) y su

concentración medida en un espectrofotómetro ND-1000 UV (Nanodrop Technologies) y almacenadas para futuros ensayos.

2.1.2 Síntesis de cDNA.

Con parte del material de RNA previamente tratados con DNAsaI (Fermentas) obtenido en el paso anterior, se procedió a realizar librerías de cDNA de frutos de todos los estadios de maduración (C1, C2, C3 y C4) y también de las muestras correspondientes a tejidos vegetativos descritos anteriormente. Para este efecto, se utilizó el kit First Strand cDNA Syntesis (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con modificaciones menores. La metodología para realizar la síntesis de cDNA, se llevó a cabo utilizando 1000 ng de RNA, con lo cual, cada reacción contuvo una concentración de RNA equivalente, posteriormente se adicionó 1 μ L de Oligo (dt), 4 μ L de 5X Reaction Buffer, 2 μ L de RiboBlock RNase Inhibitor, y 2 μ L de M-MuLV Reverse Transcriptase. Paso siguiente a la incorporación de estos reactivos, las muestras fueron incubadas por 60 minutos a una temperatura de 37° C en termociclador con una temperatura final de 75° C por 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron chequeadas mediante PCR convencional y almacenadas a -20° C hasta su posterior utilización.

2.2 Obtención del cDNA de largo completo de FcNAC1.

2.2.1 Diseño de partidores para RACE.

En el comienzo de esta tesis doctoral, nos fue posible localizar la presencia de un EST (Expressed Sequence Tags) contig proveniente de estudios realizados en nuestro laboratorio, donde se realizaron librerías supresivas sustractivas (de sus siglas en ingles SSH) construidas a partir de material de cDNA de *Fragaria chiloensis* de los distintos estadios de maduración (Pimentel y cols., 2010), mencionados con anterioridad. Esta

secuencia presentó una alta homología con otros miembros de la familia NAC, lo cual se evaluó haciendo uso del programa BLASTn (NCBI, USA). Posterior a esto y con el objetivo de obtener el largo completo de la secuencia codificante de *FcNAC1*, se procedió a realizar el diseño de partidores utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) con las correspondientes características mencionadas en las instrucciones del kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech). El par de partidores que fueron utilizados para poder amplificar el extremo 3' de la secuencia codificante de *FcNAC1* fueron: FcNAC1-RACE1 (5'-AGGAGGCCAGAATAGGGAAA-3') y FcNAC1-RACE2 (5'-TTCCTCCAAAGAAGGCTGGT-3').

2.2.2 Generación del cDNA para RACE.

De las muestras biológicas de RNA de fruto maduro obtenidas por el método CTAB con anterioridad y tratadas con DNAsaI (Fermentas), se procedió a la preparación de librerías de cDNA para RACE 3', para lo cual se utilizó el kit BD SMART™ RACE Amplification (Clontech). En tubos fueron dispensados 3 µL de RNA y 1 µL de 3'-CDS primer A, para luego completar a un volumen final de 5 µL con agua ultra pura. Los tubos fueron homogenizados con cuidado y se incubaron a 70° C por 2, para luego incubarlos por 2 minutos en hielo. Posteriormente a cada reacción de le adicionó 2 µL de 5X First-strand Buffer, 1 µL de DTT (20 mM), 1 µL de dNTP Mix (10 mM) y 1 µL de BD PowerScript Reverse Transcriptase. Las reacciones fueron incubadas por 1.5 horas a una temperatura de 42° C. finalmente, las reacciones fueron diluidas adicionando 100 µL de tampón Tricina-EDTA y se incubaron por 7 minutos a 72° C. las muestras fueron finalmente almacenadas a -20° C para su posterior utilización.

2.2.3 PCR RACE.

Se utilizó el kit SMARTTM RACE cDNA Amplification (Clontech) para las reacciones de PCR RACE 3', donde las condiciones para llevar a cabo esto fueron las siguientes: 2 µL de cDNA, 2,5 µL de Universal Primer Mix, 0,5 µL de partidor RACE (FcNAC1-RACE1 y FcNAC1-RACE1, por separado), 2,5 µL de 10X Advantage 2 PCR Buffer, 0,5 µL de 50X dNTP Mix, 0,5 µL de Advantage 2 DNA Polymerase Mix y 16,5 µL de agua libre de nucleasas. Para la amplificación mediante uso de termociclador, se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo de 3 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos cada uno de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C y 3 minutos a 72° C, para terminar la reacción con un ciclo de 20 minutos a 72° C. Los productos de estas reacciones fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % p/v.

2.2.4 Clonamiento y secuenciación de productos de RACE y clonamiento del cDNA de largo completo FcNAC1.

El clonamiento de los productos concernientes a las reacciones de RACE 3' de FcNAC1 de *Fragaria chiloensis* se realizaron haciendo uso del kit StrataClone PCR Cloning (Stratagene) siguiendo las condiciones descritas por el fabricante. Estos fragmentos fueron clonados en el vector pGemT-Easy de la empresa Promega, para lo cual el proceso de ligación se realizó siguiendo las especificaciones descritas por el fabricante. Para llevar a cabo el proceso de transformación se utilizó las células competentes Dh5α (Invitrogen) siguiendo los pasos que se describen a continuación: las células transformadas mediante shock térmico fueron crecidas durante toda la noche en placas LAXI-LB Agar, suplementadas con Ampicilina (100 mg/ml), Xgal (50 mg/ml) e IPTG (800 mM) a una temperatura de 37° C, posterior a esto, se procedió a la verificación de la transformación mediante PCR de colonias haciendo uso de los partidores T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') y SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), haciendo uso del siguiente programa en termociclador: 1 ciclo inicial de 94° C por 3 minutos; 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, para finalmente

realizar 1 ciclo de 72° C por 10 minutos. Posterior a esta verificación, las colonias positivas para nuestros insertos de interés fueron crecidas en medio líquido LB suplementado con Ampicilina (100 mg/ml) durante toda la noche con agitación en shaker a 37° C. Al día siguiente, los cultivos celulares fueron centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm y se realizó la purificación de los plásmidos haciendo uso del kit Plasmid Miniprep System (Omega Biotech) siguiendo las observaciones descritas por el fabricante. Los vectores fueron secuenciados por la empresa Macrogen, Inc. (Seúl, Korea).

Luego de realizar el ensamble de estas secuencias y del fragmento concerniente a nuestro EST de FcNAC1 haciendo uso del software CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>), nosotros realizamos el diseño de partidores con la finalidad de obtener el cDNA de largo completo de FcNAC1, haciendo uso de los siguientes pares de partidores: FcNAC1-Full-length-F: 5'-CACCATGACATGGCACTCAGATGAGG -3' (nosotros adisionamos la secuencia CACC para realizar un clonamiento direccional) and FcNAC1-Full-length-R: 5'-GTTTCCTTTGCTTGTATCTGCA -3'. Posterior a la obtencion de los partidores que fueron sintetizados, realizamos una reaccion de PCR siguiendo el siguiente programa en termociclador: 1 ciclo inicial de 94° C por 10 minutos; 35 ciclos de 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, para finalmente realizar 1 ciclo de 72° C por 10 minutos. El amplicon obtenido producto de esta reacción de PCR, fue purificada y clonada en el vector pENTER™/SD/D-TOPO®, el cual es incluido en el kit pENTER™ Directional TOPO® Cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones indicadas en el kit por el fabricante. El producto de clonamiento fue utilizado para transformar celulas de *Escherichia coli* (One Shot® TOP10, Invitrogen), las cuales fueron crecidas en placas LB-AGAR suplementadas con Kanamicina (PhytoTechnology Laboratories) a una concentración final de 25 mg/ml. Finalmente, realizamos la verificación de la presencia de nuestro fragmento de FcNAC1 cDNA con los partidores mencionados anteriormente y realizamos la purificación de los plásmidos haciendo uso del kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific™) y secuenciados estos por Macrogen, Inc. (Korea). Los vectores fueron almacenados a -20° C para posteriores análisis.

2.3 Alineamiento múltiple y análisis filogenético.

Luego de obtenida nuestra secuencia nucleotídica concerniente al cDNA de FcNAC1, analizamos la secuencia amino ácida deducida haciendo uso de la herramienta ExPASy translate (<http://ca.expasu.org>). El análisis de similaridad de secuencia entre FcNAC1 y otros miembros pertenecientes a la familia NAC fue realizado haciendo uso de alineamientos locales mediante BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA). Posterior a esto, realizamos alineamientos múltiples de las secuencias amino ácidas mediante el uso de la herramienta web server T-Coffee (<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:expresso>), paso en el cual incorporamos información de estructuras secundarias de proteínas. Finalmente, la construcción del análisis filogenético se llevó a cabo haciendo uso del software MEGA (Version 5.2; <http://megasoftware.net>) (Tamura et al. 2004)), haciendo uso del método neighbor-join con un bootstrap de 1000 repeticiones.

2.4 Modelamiento por homología y refinamiento por dinámica molecular.

La secuencia amino ácida codificante de la proteína FcNAC1 (número de acceso: KP966107.1) fue utilizada para buscar genes ortólogos con estructura cristalográfica descrita disponibles en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (Rose et al. 2010). Con los resultados obtenidos provenientes de BLAST, se seleccionó al gen NAC019 proveniente de *Arabidopsis thaliana*, del cual se encuentra disponible en la literatura su estructura cristalográfica (PDBid: 3SWM). Este último fue utilizado como plantilla para realizar un modelamiento por homología de FcNAC1. El alineamiento de secuencias entre FcNAC1 y la secuencia de 3SWM se realizó usando el programa CLUSTAL W (Larkin y cols., 2007) y el alineamiento resultante fue utilizado para el modelamiento por homología usando MODELLER V9.12 (Sali 1995) (Accelrys, San Diego, USA). El programa MODELLER tiene la particularidad de encontrar regiones conservadas y no conservadas en las estructuras proteicas. Las regiones conservadas estructuralmente de FcNAC1 fueron construidas usando a 3SWM como plantilla. Los loops y regiones variables no incluidas

en zonas conservadas, fueron construidas por defecto. Construimos 50 estructuras para FcNAC1, donde el mejor modelo con más baja energía fue refinado mediante minimización de energía por dinámica molecular.

El mejor modelo fue sometido a un loop de optimización seguido de una minimización de energía. Con la finalidad de poder refinar el modelo 3D de la proteína, los átomos concernientes a los carbonos alfa de la proteína fueron restringidos parcialmente en su movilidad usando una fuerza armónica de $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ y los loops fueron dejados libres durante la relajación. Todas las simulaciones de dinámica molecular (MDS) fueron realizadas a un tiempo de un 1fs, con una distancia de corte de 12 \AA para las interacciones no enlazantes y una función de cambio de 10 \AA para las energías de Van der Waals. La estructura obtenida fue embebida en una caja de agua ($90 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$) en condiciones periódicas de borde (Periodic Bordering Condition (PBC)) neutralizada con iones NaCl 150 mM a una temperatura de 300° K . Bajo estas condiciones, fueron realizados 2 ns de MDS usando el programa NAMD v2.6 usando el campo de fuerza CHARMM-22 (Phillips y cols., 2005). El algoritmo Particle Mesh Ewald (PME) fue empleado para calcular las interacciones electroestáticas de largo rango. Posteriormente, y con la finalidad de evaluar la certeza del modelo realizado, ProSA (Wiederstein y cols., 2007), PROCHECK (Laskowski y cols., 1993) and Verify 3D (Luthy et al. 1992) fueron utilizados. Posteriormente, fueron realizados alineamientos estructurales entre el modelo final de FcNAC1 y su templado con el objetivo de obtener la estructura homodimérica de nuestro factor de transcripción y poder apreciar la interacción con DNA, fibra la cual esta co-cristalizada en el templado.

2.5 Expresión transiente en hojas de *Nicotiana benthamiana* y localización sub-celular de FcNAC1.

Para realizar el constructo *35s:FcNAC1-GFP*, nosotros usamos recombinación mediante el kit Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix kit (invitrogen), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con modificaciones menores, haciendo uso de

cantidades equivalentes (160 ng/ul) en las concentraciones de vectores de entrada (*FcNAC1* clonado en pENTER) y vector de destino (pK7WGF2.0). Luego, se procedió a transformar bacterias (One Shot[®] TOP10 *E. coli* Quimio-competentes (Invitrogen)), las cuales fueron posteriormente plaqueadas en LB-agar suplementado con Espectinomicina (PhytoTechnology Laboratories) a una concentración final de 100 µg/ml. Las colonias resistentes fueron analizadas mediante PCR usando los partidores específicos mencionados en anterioridad para asegurar la presencia de FcNAC1 en el constructo.

El constructo *35s:FcNAC1-GFP* clonado en el vector pK7FWG2,0 fue introducido en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ElectroMAX[™] (Invitrogen), mediante shock térmico con N2. Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en un medio de selección compuesto de YM agar suplementado con Estreptinomicina (PhytoTechnology Laboratories) y Espectinomicina (PhytoTechnology Laboratories), una concentración final de 100 de cada antibiótico. Las colonias resistentes fueron analizadas mediante PCR para la presencia de cDNA *FcNAC1* usando los primers anteriormente mencionados. Colonias positivas fueron crecidas en medio selectivo YM (100 ml) e incubadas a 28° C a una OD₆₀₀ Entre 0.6 y 0.8. luego, el cultivo celular fue centrifugado por 3 minutos a 5000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en 1/3 de su volumen original, con medio de agroinfiltración MMA (sal MS (4.32 mg/L), 10 mM MES, 20 g/l sucrose y 200 mM acetoseringona). La suspensión de agroinfiltración fue utilizada para inyectar la cara abaxial de hojas jóvenes de Tabaco (dos semanas de crecimiento) y fueron colectadas muestras después de tres días post-agroinfiltración. Se utilizó la tinción Syto[®] 84 Orange Fluorecent Nucleic Acid Stain (Thermo Scientific[™]), para tratar las muestras de hojas siguiendo las instrucciones de fábrica y usamos microscopia de fluorescencia confocal para identificar la localización subcelular de FcNAC1 en las muestras de hojas con transformación transitoria.

2.6 Análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR.

Se utilizó como material biológico inicial 2 µg de RNA total, los cuales fueron utilizados para sintetizar cDNA de hebra simple para cada uno de los estadios de desarrollo y maduración de fruto mencionados con anterioridad, como también de tejidos vegetativos de la planta. Para este efecto se utilizó el kit First Strand cDNA Syntesis (Fermentas) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para una reacción final de 20 µL. Las lecturas de qRT-PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 µL, donde el mix de reacción utilizado contuvo 8 µL de H₂O, 1 µL de mix de partidores específicos a una concentración de 5 µM cada uno, 10 µL de SybrGreen (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix 2X, Fermentas) y 2 µL de cDNA en una dilución 1:4. Referente a los primers utilizados, estos fueron diseñados a partir de la zona 5' para el gen FcNAC1 y de la zona 3' para el gen FcGAPDH (utilizado como gen calibrador) haciendo uso del software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Partidor (forward/reverse)	Amplicon (bp)	Eficiencia (%)
<i>FcNAC1</i>	5'-TGGTATGAGCGGCCTCAG -3' 5'- GCTGCCCTCTCTTCTTCCTC -3'	101	96
<i>FcGAPDH</i>	5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' 5'-AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG-3'	132	93

Las especificidades de las reacciones fueron confirmadas mediante el registro de las curvas de disociación de los productos de PCR obtenidos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10 órdenes de magnitud, desde 10⁻³ a 10⁻⁹ de cada amplicon génico para realizar el cálculo de la eficiencia (E) de cada par de partidores para cada gen utilizado en este análisis, de acuerdo a la pendiente del modelo de regresión lineal:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Para realizar las lecturas de qRT-PCR, fue utilizado el termociclador Opticom-2 Real Time PCR System (MJ Research, WaterTown, MA). Para este efecto, fueron

consideradas tres replicas biológicas de cada muestra con 2 réplicas técnicas, cada una. Cada una de las réplicas biológicas fue concerniente a una extracción independiente de RNA desde un mix o *pool* de frutos o tejidos vegetativos. Para la reacción de PCR fue implementado el siguiente protocolo: 94° C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de 94° C por 15 segundos, 57° C por 15 segundos y 72° C por 20 segundos. Posterior a esto, se realizó la curva de disociación denaturando las muestras por 1 minuto a 95° C, 55° C por 1 minuto y luego aumentando la temperatura en 0,5° C cada 10 segundos empezando de 55° C hasta alcanzar los 95° C. Para las puntuaciones de Ct (*threshold cycle*) se consideraron el valor promedio de las tres replicas biológicas y las dos replicas técnicas. Los valores fueron normalizados usando los valores de Ct obtenidos para el gen de referencia *FcGAPDH*, gen el cual no muestra diferencias en sus niveles de expresión en los distintos tejidos utilizados (Pimentel y cols., 2010).

Finalmente, los valores de Ct normalizados obtenidos fueron empleados para calcular las fluctuaciones en los niveles de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras analizadas. Para tal efecto, fue utilizado en modelo descrito por (Pfaffl, 2001). Para llevar a cabo este cálculo, se utilizó la ecuación (2) para calcular la razón de expresión relativa (R), donde E corresponde a la eficiencia obtenida por los partidores para los genes analizados y ΔCt es concerniente al valor de la diferencia medida entre el Ct de la muestra control y el valor obtenido de Ct del transcrito del gen.

$$\text{Razón de expresión relativa (R)} = \frac{(E_{\text{analizado}})^{\Delta Ct_{\text{analizado}} (\text{control-muestra})}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}} (\text{control-muestra})}}$$

2.7 Ensayo funcional de transactivación transcripcional mediante técnica de luciferasa dual.

Para este análisis, fueron considerados dos fragmentos de secuencias promotoras de genes relacionados a la remodelación de la pared celular, *PL* (*Pectato liasa* (Gen Bank KC527025); 1038 bp) y *EXP2* (*Expansina 2* (GenBank KC527027); 847 bp). Estas secuencias fueron sintetizadas y clonadas en el vector pUC57 incorporando sitios de cortes por enzimas de restricción (5' NotI y 3' NcoI para *PL*) y (5' BamHI y 3' NotI para *EXP2*). Posterior a esto, mediante digestiones enzimáticas, estas secuencias fueron insertadas en el sitio de clonamiento del vector pGreenII 0800-*LUC* (Hellens y cols., 2005) y además fue utilizado la secuencia promotora del gen *FvDFR* (*Dihidroflavonol reductase* (no publicado); 1560bp) como control positivo de la técnica. El control interno es el gen *Renila* (*REN*) *LUC* comandado por el promotor constitutivo 35S. La secuencia codificante (cDNA) de largo completo de *FcNAC1* (GenBank AKC96459.1) fue clonada en el vector pHEX2 bajo el comando del promotor constitutivo 35S mediante la técnica Gateway, acorde a las instrucciones descritas por el proveedor. Nosotros además utilizamos a los genes *FvMYB10* (GenBank EU155163.1) y *FvBHLH* (Basic hélix loop hélix (no publicado); 1932 bp), los cuales se encontraban clonados en el vector pHEX2 y fueron utilizados como controles positivos de la técnica. Como el gen *GUS* (*uidA*) no ha sido relacionado a vías biosintéticas relacionadas a la remodelación de pared celular, este fue clonado en el vector pHEX2 bajo el comando del promotor constitutivo 35S y utilizado como control negativo. Todos los constructos realizados fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens* (GV3101), y estos cultivos fueron incubados a una temperatura de 28° C por 2 días. Posteriormente, se procedió a tomar una muestra de 10 µL confluyente de bacterias resuspendidas en 10 mL de buffer de agroinfiltración (10 mM MgCl₂, 0,5 µM acetoseringona) a una OD₆₀₀ entre 0,2 y 0,8. Esto fue incubado a 21° C durante 2 horas en agitación. Combinaciones de los cultivos celulares fueron usados para inyectar la cara abaxial de hojas jóvenes de plantas de *N. bentamiana* (6 semanas de crecimiento) crecidas en condiciones de invernadero. Discos de hojas fueron tomados 3 días después de la agroinfiltración, y fueron sujetos a ensayos de luminiscencia usando el kit DLAR-2 (Targeting Systems, <http://www.targetingsystem.net/>). La relación de la actividad Luc/Ren fue medida usando

el equipo Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection System, <http://www.titertekberhold.com/>) como ha sido reportado previamente por Esplay y cols, 2009.

2.8 Análisis estadísticos.

Para todos los análisis génicos de expresión relativa, nosotros usamos un diseño al azar con tres replicas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS v.14. Los análisis de varianzas (ANOVA) fueron realizados con un nivel de significancia determinado con un valor $p \leq 0,05$ usando el test (LSD) Fisher para los análisis de expresión tanto de fruto y tejido vegetativos.

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de la secuencia de largo completo del factor de transcripción FcNAC1.

Mediante la utilización de librerías supresivas substractivas (SSH) de distintos estadios de maduración de frutos de *F. chiloensis*, fue posible identificar un EST con un alto porcentaje de similitud a factores de transcripción de la familia NAC, reportados en bases de datos públicas. Considerando estos antecedentes, se procedió a realizar la obtención de la secuencia de largo completo, lo cual fue realizado haciendo uso de la técnica de Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE). Para este efecto, se procedió a diseñar partidores específicos del extremo 3', para posteriormente realizar reacciones de PCR-RACE haciendo uso de cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de frutos en estadio maduro (C4) de *F. chiloensis*. Luego de estas reacciones, fue posible aislar dos fragmentos, uno de 373 pb con el partidor FcNAC1-RACE1 y 461 pb para el partidor FcNAC1-RACE2. Luego de ensamblar estas secuencias con nuestro EST inicial, fue posible obtener una secuencia de 1260 pb (Fig. 2)

```
.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90
ATGACATGGCACTCAGATGAGGAAGAGGAAGAAGAGAGGGCAGCAGTTCAGTCAATAACCCCTCCTCTGCAACTTATCCTCAGCAATCT
.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180
AAGAATAATAAGAAACAATGAAATATCATCATGCCGTCTTGTGGCCACCCTATAGATTTCAAGACCAGGCTGGAATTATGATTTGCCG
.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270
GGACTACCAGCGGGTGAAATTTGATCCGACGGACCAGGAGATTCTTCAACATTTGGAGGCAAAAAGTGCCTCACTGATACCAGAAAGCTT
.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360
CATCCACTCATTGATGAATTCATACCAACGCTTGATGGAGAGAATGGAATCTGCTCTACCACCCAGAAAAGCTACCAGAGTTAACA
.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450
GAGGACAGATCCGGCCACTTTTTTCACCGACCCCTCAAAGGCCTATACCACCCGGAACCCAGGAAGCGAAGGATTCACACCCAGAGAGAT
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540
GGAAGCGAGACAAGATGGCACAAAACAGGCAAGACAAGGCCAGTCTTAGCCAAATGGAGCAGTCAAGGGTTTCAAAAAGATCTTGGTCCTC
.....550.....560.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630
TACCAACTACGGCAGGCAAGGAAAGCCGAGAGACGAATTTGGGTGATGCACCAGTACCACCTTGGCAACAATGAAGAGAGAGGAT
.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720
GGGAGCTAGTGTATCTAAGGTCTTTTACCAAAACACAACCTAGGCAATGGTACTGGCACTCCAAGTATCAGAGATGGTGGTCTCCA
.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800.....810
TTGTTGAATCCATTTGATAGCCATCATTATAAAGGTCAGTGAATATTCGTAGTGGCAAGATGGGATTCCTCTTCTATTCTCCAAAG
.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900
AAGGCTGGTGTATGGAGTATTACAATCATAATCATCTGGTCTTTTTATGAACTATGAGCATCCTCATTAATTCAGAGGCGCAGAAAT
.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990
AGGAAATCCCGCTCAACTAATTTCTAACTGGTCTTCATGGTGACGGGTCTTCGTTGTTTCGATACAAATGCTGCAGATACAAGCAA
.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050.....1060.....1070.....1080
GGAACTAATTTAGAGGAAAATATAGTCATGGGTCTATATCATGACCATGGAATACATGGAAAAGTTTTATATCGAGGTAGCTTAACTAGT
.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170
TTAGAGCAGCAGTACATAATACCTTCTTTTCCCATGCCATTATACTCATTTGTTTTGATTTGCACATTTATATAGTTTTGGTTAGAG
.....1180.....1190.....1200.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260
AAATTCGTCGAATGGTATATGAACCTTTGCTCATTATAAAGTTGGTATATCAAGTCCAAAAA
.....1260
```

Figura 2. Secuencia de largo completo obtenida para *FcNAC1*.

Posterior a la obtención de la secuencia nucleotídica que da cuenta del FT FcNAC1, se procedió a realizar el análisis de esta mediante el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en línea. Esta secuencia fue anotada en la base de datos Genbank como FcNAC1 (número de accesoión AKC96459.1). A su vez, se analizó haciendo uso de la base de datos no redundante de NCBI BLAST (blstn), donde los resultados mostraron que FcNAC1 presentó un alto porcentaje de identidad con genes que codifican para factores de transcripción de la familia NAC presentes en distintas especies, como: *Fragaria vesca* (99%) (N° accesoión XM_004293847), *Prunus mume* (89%) (N° accesoión XM_016793114), *Malus x domestica* (87%) (N° accesoión XM_008373197), *Pyrus x bretschneideri* (86%) (N° accesoión XM_009346366) y *Vitis vinífera* (81%) (N° accesoión XM_002278625).

Considerando la secuencia nucleotídica perteneciente a FcNAC1, fue posible predecir la composición amino ácida que da cuenta del ORF de nuestro factor de transcripción, el cual contiene 999 pb. Para tal efecto, se hizo uso de la herramienta de traducción que se encuentra disponible en ExPASy (<http://ca.expasy.org/>). Este análisis permitió determinar que el factor de transcripción se encuentra compuesto por un total de 332 aminoácidos (sin codón de término), el cual se muestra en la figura 3, con una masa molecular teórica de 37.33 kDa y un punto isoelectrico teórico de 7.04. El peso molecular predicho para FcNAC1 es coincidente con el de otras proteínas de la familia NAC descritas en *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo: AtNAC3 presenta un peso molecular de 35.4 kDa (Takada y cols., 2001), ANAC con 35.8 kDa (Greve y cols., 2003) y ANAC072 con 32.7 kDa (Yamaguchi-Shinozaki y cols., 1992). Además, se evidencia que esta secuencia presenta señalización de localización nuclear, lo cual fue predicho con la herramienta en línea NLS Mapper (Figura suplementaria 1).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MTWHSDEEEEEERAAVQSI TPSSATYPQQSKNNKNEISSCPSCGHPIDFQDQAGIHDLPLGLPAGVKFDPTDQELIQLHLEAKVLTDRKLL
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HPLIDEIFIPTLDGENGICSTHPEKLPGVNKEGQIRHFFHRPSKAYTTGTRKRRKVHTEEDGSETRWHKTGKTRPVLANGAVKGFKKILVL
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
YTNYGRQRKPEKTNWVMHQYHLGNNEEEKDDELVLKSVFYQTQPRQCGTGPSIRDGGPPLLNPFDSSHYKGQVNIIRSGQDGIPLPIPPK
      280     290     300     310     320     330
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
KAGVMEYYNHNHPGPFMNYEHPHLIQGGQNRREIPAQLIPNMVLHGDGSSLFRYNAADTSKGN

```

Figura 3. Secuencia amino ácida del factor de transcripción FcNAC1.

La secuencia amino ácida que codifica para FcNAC1 contiene en su extremo N-terminal una región altamente conservada, la cual es descrita en la literatura como el dominio NAC. Este dominio se encuentra a su vez subdividido en 5 subdominios: A) que comprende desde el residuo 61 al 79, B) desde el residuo 98 al 121, C) desde el residuo 124 al 163, D) desde el residuo 172 al 203 y E) desde el residuo 209 al 221) y hacia el extremo C-terminal de la proteína, se presenta una zona de regulación transcripcional (Fig. 4). El dominio NAC ha sido descrito en miembros de esta familia y en otras especies modelos como *A. thaliana* y *O. sativa* (Ooka y cols., 2003; Fujita y cols., 2004) donde se estipula que éste es altamente conservado a nivel aminoacídico, presenta una estructura secundaria característica altamente conservada y que cumple funciones de reconocimiento e interacción con el DNA (Olsen y cols., 2005).

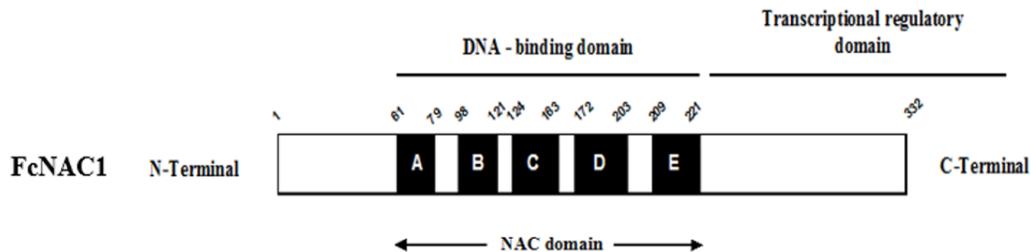


Figura 4. Representación esquemática del factor de transcripción FcNAC1, donde se muestra el dominio de unión a DNA, dividido en 5 subdominios (A-E), el dominio NAC y el dominio de regulación transcripcional. Previo al dominio NAC, se encuentra la extensión de la zona N-terminal.

Considerando la secuencia amino acídica de FcNAC1 y otros miembros de la familia NAC depositados en bases de datos públicas, se procedió a realizar un análisis de alineamiento múltiple, el cual mostró el alto grado de conservación que presenta principalmente el dominio NAC, siendo el extremo C-terminal altamente variable entre las secuencias utilizadas para el análisis (Fig. 5). FcNAC1 presentó los siguientes porcentajes de identidad de secuencias contra los otros factores de transcripción: SND2 (62,63 %), NST1 (22,54 %), SND1 (21,1 %), CUC1 (25,32 %), ATAF1 (28,06 %), ATAF2 (25,95 %), CitNAC (24,64 %) y AtNAP (22,69 %). Existe información en la literatura que describe la clasificación, en función de la estructura primaria, de esta familia de factores de transcripción donde se han descrito seis tipos de estructuras de estas proteínas: I) Proteínas con dominio NAC altamente conservado en el extremo N-terminal, subdividido en 5 subdominios conservados y una zona C-terminal. II) Proteínas con dominio NAC altamente conservado en N-terminal, presentando un dominio regulatorio negativo de la transcripción (represor) entre los subdominios (D-E) y una zona C-terminal que podría contener algún motivo transmembranal (TM). III) Solo el dominio NAC sin zona C-terminal. IV) Dos dominios NAC en tándem desprovistos de zona C-terminal. V) Dominio NAC altamente conservado con una extensión en la zona N-terminal (NTE) y zona C-terminal altamente divergente y VI) Proteínas VOZ, donde el dominio NAC carece de zona C-terminal y el dominio de transactivación se encontraría en el extremo N-terminal presentando motivos zinc-finger actuando como dominios de unión a DNA conservados (Purinak y cols., 2012). Cuando realizamos nuestro análisis de alineamiento múltiple entre FcNAC1 y los principales miembros descritos de la familia NAC, fue posible apreciar que la secuencia amino acídica FcNAC1, FvNAC y SND2 presentan una extensión en la zona N-terminal, lo cual es anterior al dominio NAC, además de poseer extremos C-terminales con una baja similitud entre ellos. Esto nos permite inferir que FcNAC1, SND2 y FvNAC pertenecerían al grupo V, según la clasificación descrita por Purinak y cols.

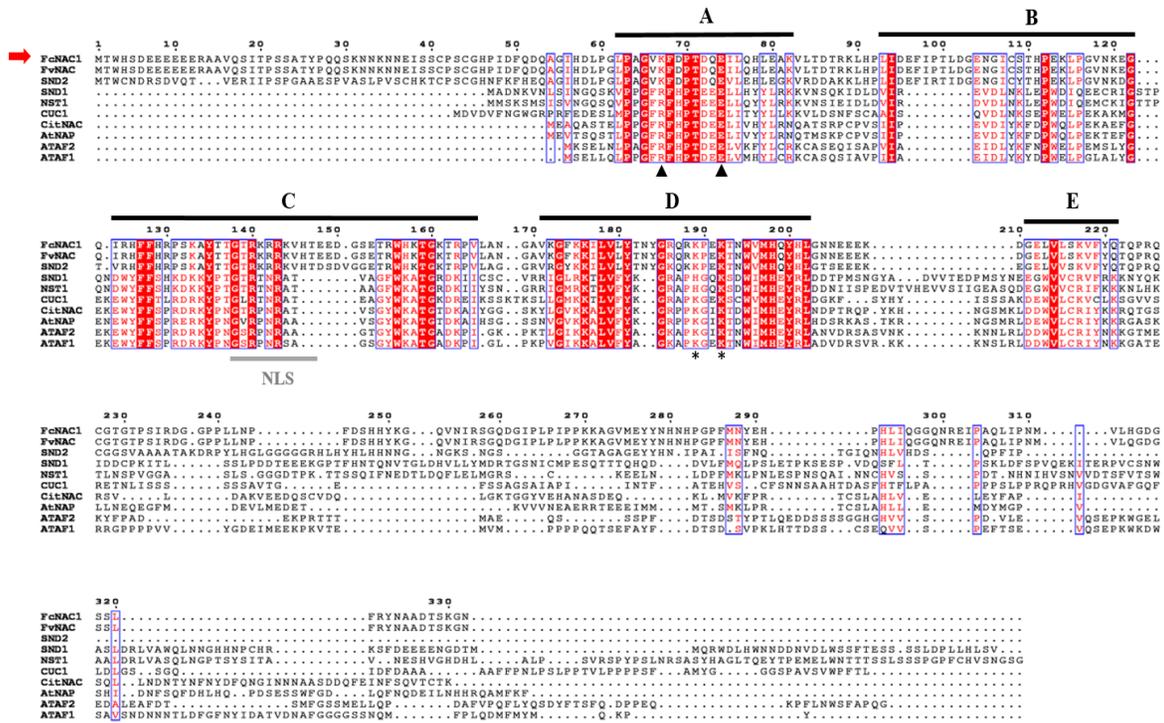


Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencia amino acídica deducida de FcNAC1 y diferentes miembros de la familia NAC. El alineamiento fue realizado con el programa ESPrift3.0 (<http://esprift.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>). FcNAC1 se encuentra marcado con una flecha roja. Con triángulos rojos se indican los residuos implicados en la dimerización. Con asteriscos se indican los principales residuos implicados en la interacción con el DNA. Las cajas representan los 5 subdominios presentes en el dominio NAC. (Números de accesiones: FvNAC (XP_004293895), FcNAC1 (AKC96459), NST1 (NM_130243), SND1 (EF101892), CUC1 (EU550396.1), ATAF1 (NM_100054.3), ATAF2 (NM_147856.4), CitNAC (EF185419.1), AtNAP (NM_105616.4) y SND2 (NC_003075.7)).

3.2. Análisis filogenético.

El Dominio NAC (NAM/ATAF/CUC) es un motivo amino acídico que está altamente conservado, el cual define uno de los grupos de factores de transcripción específicos de plantas más grande descritos en la literatura (Zhu y cols., 2012). Estos se encuentran involucrados en una amplia gama de roles incluyendo desde desarrollo a respuestas medioambientales. Bajo esta perspectiva, y con el objetivo de poder obtener algún grado de aproximación a cual podría ser la potencial función que estaría realizando

FcNAC1 en *F. chiloensis*, se procedió a la construcción de un árbol filogenético con 22 secuencias aminoacídicas de miembros de la familia NAC con funciones conocidas, incluyendo representantes de distintos organismos, tales como: Arabidopsis, tomate, cebada, arroz, citrus, petunia, leguminosa y una secuencia homóloga a FcNAC1 proveniente de *F. vesca*, con el objetivo de reproducir los diferentes grupos funcionales reportados previamente en la literatura. Los resultados de este análisis se observan en la figura 6, en la que FcNAC1 se encuentra ubicado en una agrupación relacionada a la formación de pared celular, cercano a FvNAC1 (compartiendo un 99% de identidad de secuencia aminoacídica) y SND2. En nuestro árbol filogenético fue posible encontrar 6 sub-grupos funcionales, de los cuales los primeros 5 concuerdan con información que han sido previamente descrita en la literatura (Yong-Zhong y cols., 2009). Fue posible identificar un grupo relacionado a la formación de pared celular (SWN masters switch), compuestos por SND1, NST1 y NST2, sobre los cuales se describe en la literatura que pertenecen a reguladores maestros de la formación de pared celular (Zhong et al. 2014). Referente al último sub-grupo funcional, es posible apreciar que FcNAC1 agrupó con FvNAC y SND2, donde es atinente mencionar que en la literatura es posible encontrar evidencia que sustenta la participación de este último factor de transcripción en la regulación de genes relacionados a la remodelación de pared celular. Ha sido descrito que la sobre-expresión de *SND2* en *A. thaliana* promueve la expresión de genes pertenecientes a las rutas biosintéticas de celulosas, xylanos, mananos, pectinas y polimerizaciones de ligninas, jugando así un importante rol en la red transcripcional de la formación de pared celular (Hussey et al. 2011). Basándonos en esta información y el análisis filogenético se aventura hipotetizar que el factor de transcripción FcNAC1 podría contribuir al proceso de ablandamiento frutal durante el desarrollo y maduración del fruto de *F. chiloensis*.

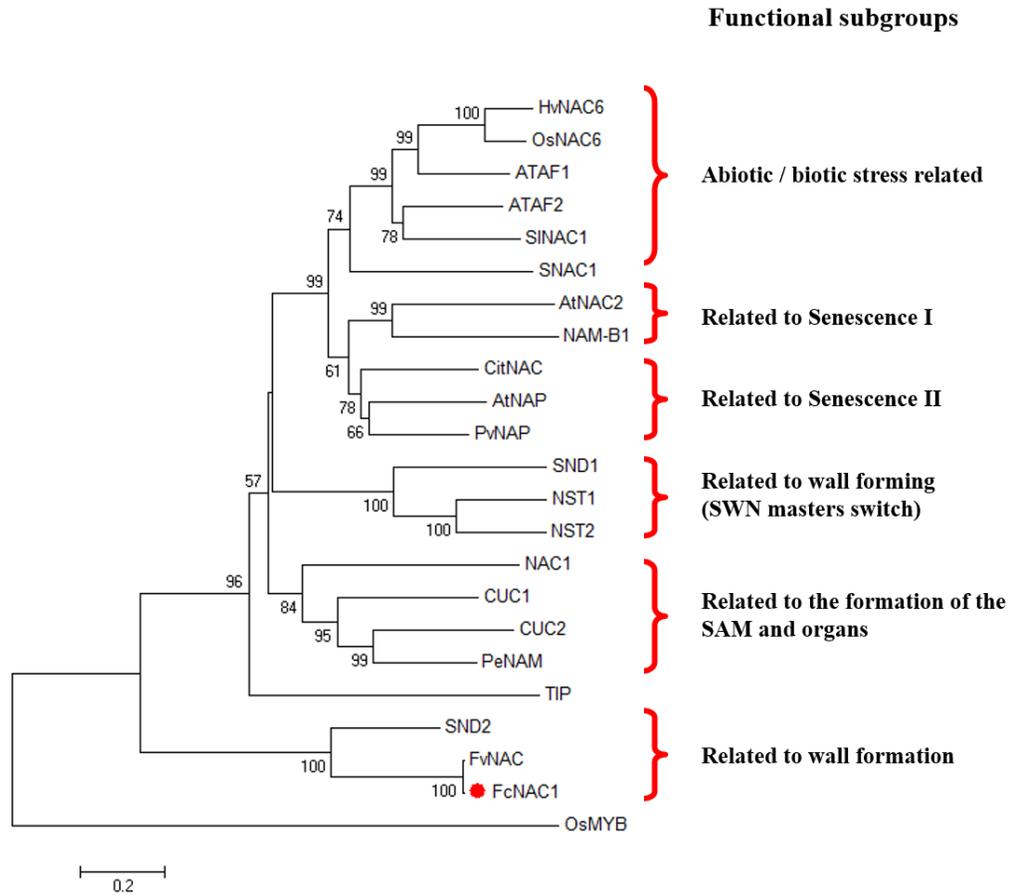


Figura 6. Análisis filogenético de FcNAC1 con miembros de la familia NAC con función conocida. Como se aprecia en la imagen, FcNAC1 agrupa con miembros de la familia NAC relacionados a la formación de pared celular, cercano a SND2. Para este análisis fueron utilizadas las siguientes secuencias amino acídicas: (Números de accesoión: HvNAC6 (AM500854.1), OsNAC6 (AB028185.1), ATAF1 (NM_100054.3), ATAF2 (NM_147856.4), SINAC1 (NM_001247553.3), SNAC1 (KM265360.1), AtNAC2 (AB049071.1), NAM-B1 (KF541318), CitNAC (EF185419.1), AtNAP (AJ222713), PvNAP (XP_007158644), SND1 (EF101892.1), NST1 (NP_182200), NST2 (NP_191750), NAC1 (NP_175997), CUC1 (NP_188135), CUC2 (AB002560), PeNAM (X92205), TIP (NP_197847), SND2 (NP_194579), FvNAC (XP_004293895) y FcNAC1 (AKC96459)). El factor de transcripción OsMYB (CAA72218) fue utilizado como control (rama externa) y el árbol filogenético fue realizado con el programa MEGA5, haciendo uso del algoritmo neighbor joining, con 1000 réplicas.

3.3. Análisis de expresión del gen *FcNAC1* en frutos y tejidos vegetativos.

Con la finalidad de detectar la variación en la tasa transcripcional de los RNA mensajeros que codifican para *FcNAC1*, se evaluó la expresión relativa del gen *FcNAC1* por medio de real time PCR (qPCR). Para este efecto, se procedió a extraer RNA de frutos considerando los cuatro estadios de maduración descritos previamente (C1, C2, C3 y C4) y de tejidos vegetativos: flores, hojas, raíces, tallos y estolones.

Luego de realizados los análisis, fue posible apreciar que *FcNAC1* presenta patrones de expresión diferencial tanto en los distintos estadios de maduración del fruto, como también en los tejidos vegetativos. El perfil de expresión de *FcNAC1* arrojó que los niveles de transcritos son bajos en los estadios C1 y C2, los cuales corresponden a estadios inmaduros de desarrollo y maduración frutal, no presentando diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Sin embargo, un notorio cambio en el perfil transcripcional ocurre en la transición entre los estadios C2 y C3, manteniendo este incremento hacia el estadio C4 (Fig. 7 A). Por otro lado, tejidos vegetativos fueron evaluados para identificar la específica expresión de *FcNAC1*. Los análisis de expresión génica mostraron que los niveles de transcritos de *FcNAC1* fueron altos en flores y tallos, pero no así en hojas, raíces y estolones (Fig. 7 B).

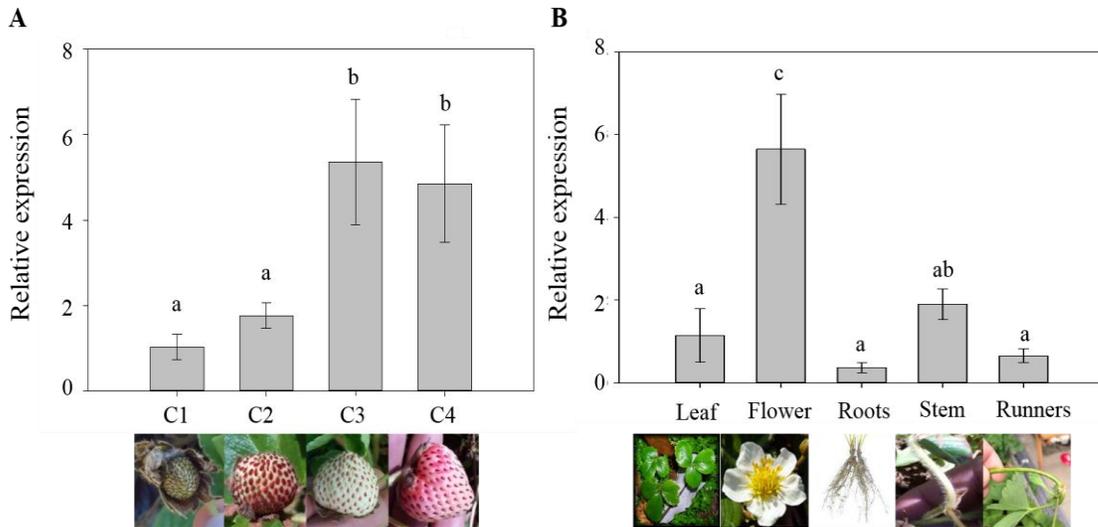


Figura 7. Análisis de expresión relativa del gen *FcNAC1* en diferentes tejidos. A) qRT-PCR durante el desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis* (C1, C2, C3 y C4). B) qRT-PCR de diferentes tejidos de la planta (hojas, flores, raíces, tallos y estolones). Todas las extracciones de RNA desde las muestras fueron realizadas usando el método CTAB (Chang et al. 1993). El gen *FcGAPDH* fue utilizado como gen calibrador. Asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) comparado contra C1, en el caso de los frutos y hoja en el caso de los tejidos vegetativos.

Aún no se conoce en detalle como ocurre el proceso de maduración y ablandamiento de *F. chiloensis*. Se describe en la literatura que diversas enzimas y proteínas no hidrolíticas relacionadas al proceso de ensamblaje y desensamblaje de la pared celular incrementan concomitante con los estadios de maduración. En este sentido, *EXP2* (*Expansine 2*), *PL* (*Pectate lyases*), *PG* (*Polygalacturonases*) (Figuroa y cols., 2008) y *XTHs* (*Xyloglucan endo/transglycosilase Hidrolase*) (Opazo y cols., 2010) incrementan tanto sus transcritos como sus actividades enzimáticas a medida que progresa el proceso de maduración. Conjunto con esto, ha sido reportado que la firmeza de los frutos presenta una abrupta caída entre la transición de los estadios C2 y C3 (Opazo y cols., 2010). Los niveles de los transcritos de *FcNAC1* incrementan en el proceso de transición de los estadios C2 y C3, manteniéndose hasta el final de la maduración de los frutos de *F. chiloensis* (Fig. 7, A). Por otro lado, a la fecha existe información de datos transcriptómicos en la especie modelo *F. vesca*, que abarcan desde el comienzo de la floración hasta el desarrollo temprano del

fruto, lo cual es reportado por Kang y cols., (2013). Al analizar estos datos que se encuentran disponible en línea, es posible determinar que el gen *FvNAC* (Gene29766), homólogo a *FcNAC1* y con una identidad de secuencia de 99%, exhibe expresiones diferenciales, mostrando altas acumulaciones de transcritos después de 9 días pos antesis en tejidos concernientes a partes del fruto. Coincidentemente, fue posible apreciar la ocurrencia de una alta acumulación de transcritos de *FcNAC1* en los tejidos de flor. Adicional a lo mencionado anteriormente, existe información en la literatura donde se describen genes codificantes de enzimas y proteínas relacionadas a la remodelación de la pared celular, como: *Expansinas*, *Pectato liasas* and *Poligalacturonasas* (Figuroa y cols., 2008), *Endoglucanasas* (Pimentel y cols., 2010) and *Xyloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas* (Opazo y cols., 2010). Estas exhiben un incremento en sus perfiles transcripcionales a medida que los frutos de *F. chiloensis* avanzan en el proceso de maduración. En este sentido, es posible identificar que los genes *Endoglucanasa*, *Expansina*, *Poligalacturonasa*, *Pectato liasa* and *Xyloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa* presentan también expresiones diferenciales durante el desarrollo y maduración de frutos de *F. vesca* (Kang y cols., 2013). Cabe mencionar que es posible identificar en las secuencias promotoras de estos genes relacionados a la remodelación de la pared celular, elementos en *cis* que son reconocidos por factores de transcripción NAC (Figura suplementaria 2), lo que nos lleva a hipotetizar que podría existir algún tipo de regulación transcripcional de estos genes relacionados a la remodelación de la pared celular por parte del factor de transcripción *FcNAC1*.

3.4. Clonamiento y localización subcelular de *FcNAC1*.

Es ampliamente descrito en la literatura que los factores de transcripción deberían estar alojados en el núcleo para así poder cumplir con sus roles de promover la transcripción de genes y además contener en sus secuencias amino ácidas, señales de localización nuclear. Bajo esta perspectiva y con la finalidad de poder evidenciar la localización sub-celular de *FcNAC1*, se realizó el clonamiento y ensayos de transformación transiente de hojas de tabaco de este factor de transcripción, para posteriormente someter nuestros resultados a microscopía confocal. Para tal efecto, fusionamos *FcNAC1* a *GFP* en

el vector pK7FWG2.0 bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S, que permitió generar una expresión constitutiva de nuestro factor de transcripción. Después de 3 días post-agroinfiltración, fue posible evidenciar una fuerte señal de fluorescencia en los núcleos de las células de las hojas de tabaco agroinfiltradas con el constructo *35S::FcNAC1-GFP* (Fig. 8). Cuando realizamos predicciones de señalización nuclear, fue posible identificar a la secuencia GTRKRRKVHT como señal de localización nuclear, ubicada en el sub-dominio C de la proteína. Cabe mencionar que ésta misma señal es conservada en otros miembros de la familia NAC como SND2 y FvNAC (Fig. 5). Al mismo tiempo, fue posible determinar que ésta señal es conservada entre miembros de la familia NAC perteneciente al género rosaceae. Actualmente, es posible encontrar información en la literatura que da cuenta de patrones de localización sub-celular de miembros de la familia NAC con resultados similares a los nuestros, por ejemplo: el gen NAC proveniente de *Solanum lycopersicum* fue localizado en el núcleo (Qinqin y cols., 2012). La proteína AtNAC2 fue encontrada en el mismo organelo de células epidermales de cebolla (He y cols., 2005), así como también, SINAC3, sobre el cual se describe que podría estar involucrado en la percepción de estímulos medio ambientales y endógenos, probablemente respondiendo a estreses de tipo salinos y sequía, el cual también se presenta alojado en el núcleo (Han y cols., 2012). Finalmente, se ha descrito a MtNST1 como un regulador maestro de la biosíntesis de pared celular, el cual también se encuentra en el núcleo de células epidermales de hojas de tabaco (Wang y cols., 2011)

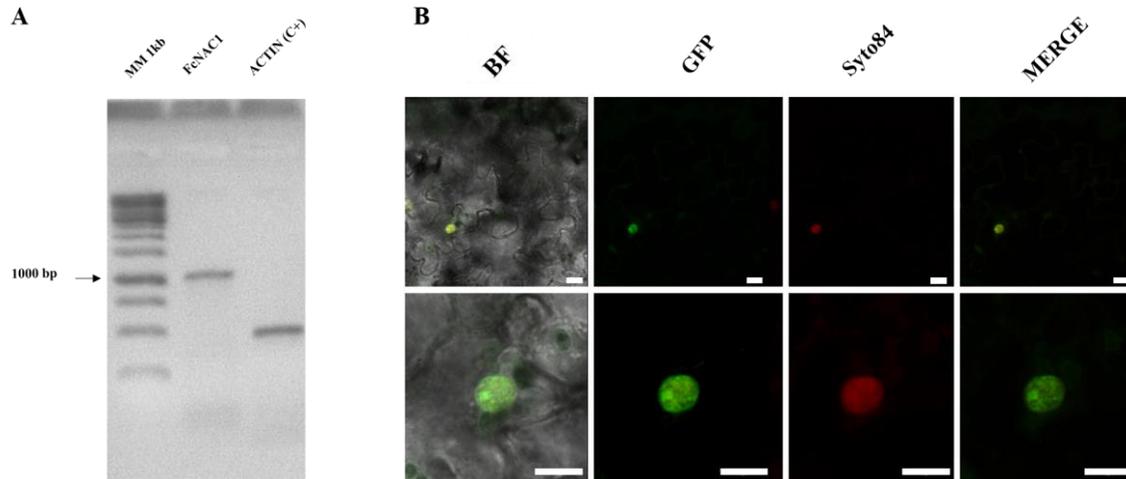


Figura 8. Amplificación del cDNA FcNAC1 y su localización nuclear. Izquierda, electroforesis en gel de agarosa (1,5%) donde se evidencia el producto de PCR para FcNAC1, amplificado desde el vector pENTER™/SD/D-TOPO®. Derecha, ensayo de co-localización con *FcNAC1* fusionado a *GFP* en el vector pK7WGF2.0. La tinción Syto84 fue utilizada para localizar el núcleo. Cepas de *Agrobacterium Tumefaciens* LV300 fueron usadas para transformar transientemente hojas jóvenes de plantas de tabaco (de 6 semanas). MM 1kb: marcador de peso molecular 1000 pb, ACTIN: control positivo del PCR, BF: campo claro, GFP: proteína fluorescente verde, Syto84: tinción nuclear, MERGE: superposición de las imágenes y la barra blanca corresponde a 10 μ m.

3.5. Análisis funcional *in-planta* del gen *FcNAC1* por transactivación transcripcional.

Con el objetivo de poder acrecentar la información relacionada a la función que podría estar realizando el factor de transcripción FcNAC1 durante el proceso de maduración y ablandamiento de los frutos de frutilla blanca, se realizó un ensayo funcional de luciferasa dual en hojas de *N. bentamiana*, en donde se evaluó la actividad transcripcional de FcNAC1 en el reconocimiento de secuencias promotoras de genes relacionados a la remodelación de pared celular, promoviendo la expresión de un gen reportero (*Luciferasa*).

Se describe en la literatura que los factores de transcripción de la familia NAC, son capaces de reconocer elementos en *cis* presentes en las regiones promotoras de genes que

contienen sitios de interacción con estos factores de transcripción, conocidos como NACBS (de las siglas en inglés NAC binding sites) como describe Aida y cols., (1997). Bajo esta perspectiva, realizamos un análisis *in-silico* de dos secuencias pertenecientes a promotores de genes relacionados a la remodelación de pared celular provenientes de *F. chiloensis*, *PL* (*Pectato liasa*) y *EXP2* (*Expansina 2*) reportados por Concha y cols., (2013), donde fue posible identificar la presencia de elementos en *cis* del tipo NACBS en estas secuencias promotoras mediante el uso de la herramienta PlantPan 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter.php>).

Conciderando la información anteriormente mencionada, se procedió a realizar constructos para ensayos funcionales de luciferasa dual, en la que se empleó el constructo 35S:*FcNAC1* en el vector pHEX y las secuencias promotoras de los dos genes relacionados a la remodelación de la pared celular en el vector pGREEN-0800LUC. Además, se realizó la transactivación de la secuencia promotora del gen *FvDFR* por los factores de transcripción *FvMYB10* y *FvBHLH*, los cuales fueron utilizados como controles positivos de la técnica. Los resultados de la relación REN/LUC no arrojaron diferencias estadísticamente significativas para las plantas que fueron transformadas con la combinación 35S:*FcNAC1* y *proFcEXP2*:LUC, en relación a su respectivo control. Por otro lado, una alta actividad transcripcional fue observada para las plantas que fueron agroinfiltradas con la combinación 35S:*FcNAC1* y *proFcPL*:LUC (Fig. 9). Finalmente, el control negativo utilizado en este experimento, la secuencia promotora del gen *FvDFR*, no fue transactivado por el producto del gen *FcNAC1*, pero si fue transactivado por la combinación de los factores de transcripción *FvMYB10* y *FvBHLH*.

El experimento de luciferasa dual, evidenció por primera vez la transactivación de una secuencia promotora de genes relacionados a la remodelación de la pared celular provenientes de frutillas chilena blanca mediante un factor de transcripción NAC. Este hecho es importante, ya que existe información respecto a proteínas NAC y la modulación de la expresión de genes relacionados a la maduración y desarrollo frutal, pero en otros aspectos, como color y aroma, no así relacionados al proceso de remodelación de la pared celular y, por ende, al ablandamiento frutal. En este sentido, podemos mencionar que se ha

descrito en la especie modelo *P. persica* que los genes *PpNAC1* y BLOOD (BL), ambos miembros de la familia NAC, son capaces de transactivar el promotor del gen *PpMYB10*, mediante la formación de heterodímeros. A su vez, se describe que el gen *PpMYB10* es un gen clave en la ruta biosintética de antocianinas, lo cual hace que los genes *PpNAC1* y BLOOD (BL) sean actores claves en la coloración de duraznos (Zhou et al. 2015). Otro ejemplo reciente de la participación de FT NAC en la maduración frutal, se evidencia en la especie *A. Arguta*, donde ha sido demostrado que existe una alta producción de terpenos en este fruto, mediado por la activación del promotor del gen *AaTPSI* por factores de transcripción del tipo NAC, argumentando así que FT NAC son importantes en el control de la producción de monoterpenos en frutos de kiwi (Nieuwenhuizen et al., 2015).

Los resultados indican que *FcNAC1* regula de forma positiva la secuencia promotora del gen *FcPL* en un orden de magnitud, pero no se evidencia el mismo comportamiento con las secuencias promotoras de *FcEXP2* y *FvDFR* (Fig. 9). Esta evidencia, permite hipotetizar un posible rol por parte del producto génico de *FcNAC1* en la regulación transcripcional de genes relacionados al metabolismo de las pectinas y, en este sentido, estar contribuyendo con el proceso de remodelación de la pared celular durante el desarrollo y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*.

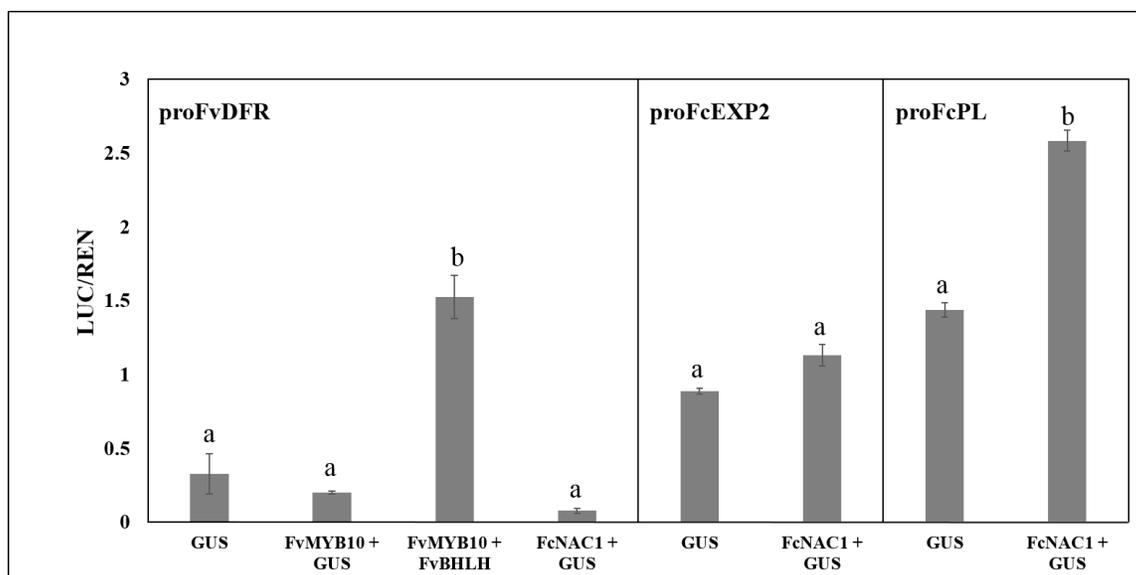


Figura 9. Ensayo funcional del gen *FcNAC1* mediante transformación transiente de hojas de tabaco. Razón LUC/REN obtenida a través de ensayo luciferasa dual entre la interacción del gen *FcNAC1* con secuencias promotoras de los genes *proFvDFR* (*Dihydroflavonol reductasa* (no publicada); 1560 pb), *proFcEXP2* (Expansina 2 (número de accesoión de GenBank KC527027); 847 pb) y *proFcPL* (Pectato liasa (número de accesoión GenBank KC527025); 1038 pb) en hojas de *N. benthamiana* transformadas mediante *A. thumefaciens*. *GUS* representa el plasmidio 35SPro-GUS (control negativo). *FvMYB10* (número de accesoión GenBank EU155163.1) y *FvBHLH* (Basic hélix loop hélix (no publicada); 1932 pb) fueron usados como controles positivos de la técnica. Las barras representan la medición de luminiscencia de 4 réplicas y las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) comparados con sus respectivos controles *GUS*.

3.6. Modelamiento estructural del dominio NAC presente en el factor de transcripción FcNAC1.

Debido a que en la actualidad no existe información a nivel estructural de factores de transcripción de la familia NAC en la especie *F. chiloensis*, es que se planteó como propósito realizar el modelamiento por homología del dominio NAC presente en FcNAC1. Esto permitió comprender la conformación estructural a nivel atómico del dominio de este factor de transcripción, y a su vez, obtener información relevante concerniente a su estructura secundaria, residuos importantes implicados en la dimerización de estas

proteínas, posicionamiento en el reconocimiento del DNA y potenciales residuos implicados en esta interacción.

Se realizó el modelamiento por homología del dominio NAC concerniente al monómero FcNAC1 utilizando como templado la estructura cristalográfica del dominio NAC ANAC019 (código PDB: 3SWM), proveniente de *A. thaliana* (Welner y cols., 2012). El alineamiento múltiple entre la secuencia deducida del dominio NAC para FcNAC1 contra la cadena A de nuestro templado 3SWM presentó un 29% de identidad de secuencia y un 47% de similitud, sin embargo, el modelo obtenido arrojó un alto grado de conservación a nivel de la estructura secundaria (Fig. 10).

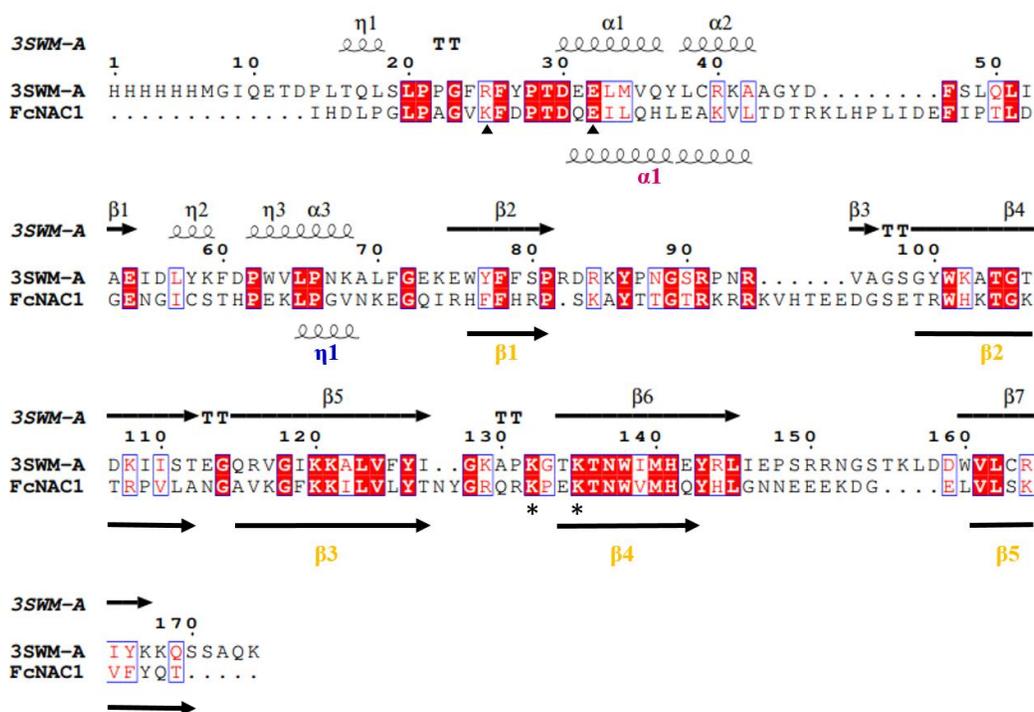


Figura 10. Alineamiento múltiple del dominio NAC presente en FcNAC1 y la cadena A del cristal 3SWM. Alineamiento múltiple incluyendo información de estructura secundaria realizado con el programa ESPript 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>). Espirales y flechas en la parte superior se las secuencias representan la estructura secundaria del templado, mientras que las ubicadas en la parte inferior corresponden a la estructura secundaria predicha del dominio NAC presente en FcNAC1. Triángulos indican residuos importantes para el proceso de dimerización y asteriscos indican residuos conservados para la interacción con el DNA.

Con la finalidad de obtener una estabilidad geométrica del dominio NAC presente en FcNAC1, fueron realizados 2 nanosegundos de simulación de dinámica molecular (SDM), mostrando un RMSD (de sus siglas en ingles Root Mean Square Deviation) de $\sim 1.45 \text{ \AA}$ respecto a los carbonos α que componen la columna vertebral del modelo, dando a entender con esto que nuestro dominio modelado alcanzó una estabilidad conformacional durante este tiempo de simulación de dinámica molecular (Fig. 11).

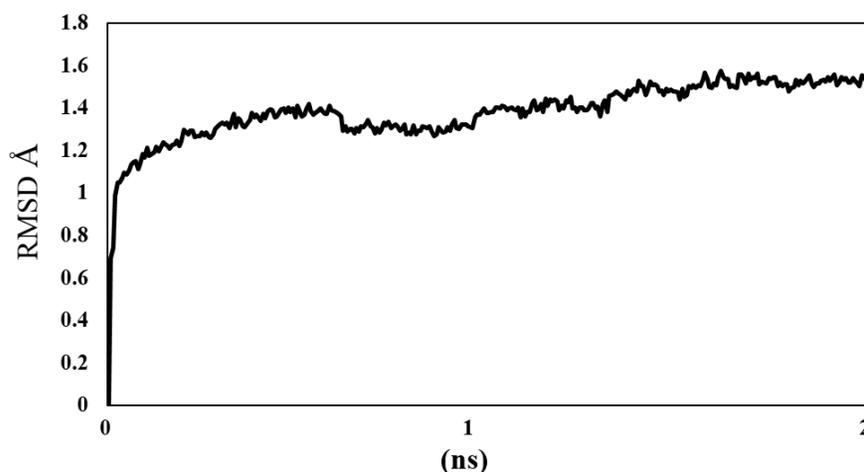


Figura 11. Simulación de dinámica molecular del monómero FcNAC1. El gráfico de RMSD fue calculado para los átomos del backbone durante los 2 ns de dinámica molecular.

Posterior a este paso, el modelo fue sometido a evaluaciones estereoquímicas de los residuos que componen el dominio de la proteína, para lo cual se utilizó el programa PROCHECK (Laskowski y cols., 1993). Los resultados arrojaron que el 82.4% de los residuos que componen la estructura son clasificados en regiones estereoquímicamente favorable, no encontrando residuos mal modelados (Tabla 1)

	Core (%) ^a	Allow (%) ^b	Gener (%) ^c	Disall (%) ^d
FcNAC1-NAC domain	82.4	16.8	0.8	0

^aMost favorable regions. ^b Additional allowed regions. ^c Generously allowed regions. ^d Disallowed regions.

Tabla 1. Validación de la estructura proteica del dominio NAC FcNAC1 mediante el programa PROCHECK.

El análisis con el programa ProSA mostró un Z-Score de -6.33, lo cual clasificó a nuestro modelo con estructuras cristalográficas obtenidas por resonancia magnética nuclear, las cuales se encuentran en las bases de datos públicas (Figura suplementaria 3). Finalmente, la conformación estructural del dominio NAC del factor de transcripción FcNAC1 está compuesto de 1 α hélices, 1 α hélice 3_{10} , 5 sábanas β y 8 loops, formando una estructura de sábanas β torcidas, las cuales están compactadas entre un α hélice en el extremo N-terminal por un lado y una corta hélice 3_{10} en el otro extremo (Fig. 12 A). Además, fue posible apreciar que existe un alto grado de conservación de la estructura secundaria en el dominio NAC, lo cual fue determinado mediante alineamientos estructurales entre el monómero de FcNAC1 y la estructura cristalográfica utilizada como templado para realizar el modelamiento por homología, resultando en un valor de RMSD de 2.5 Å. Dicho cálculo toma en consideración los carbonos α presentes en la columna vertebral de FcNAC1 respecto al templado de referencia, donde las regiones que presentan principalmente variaciones corresponden a los loops (Fig. 12 B).

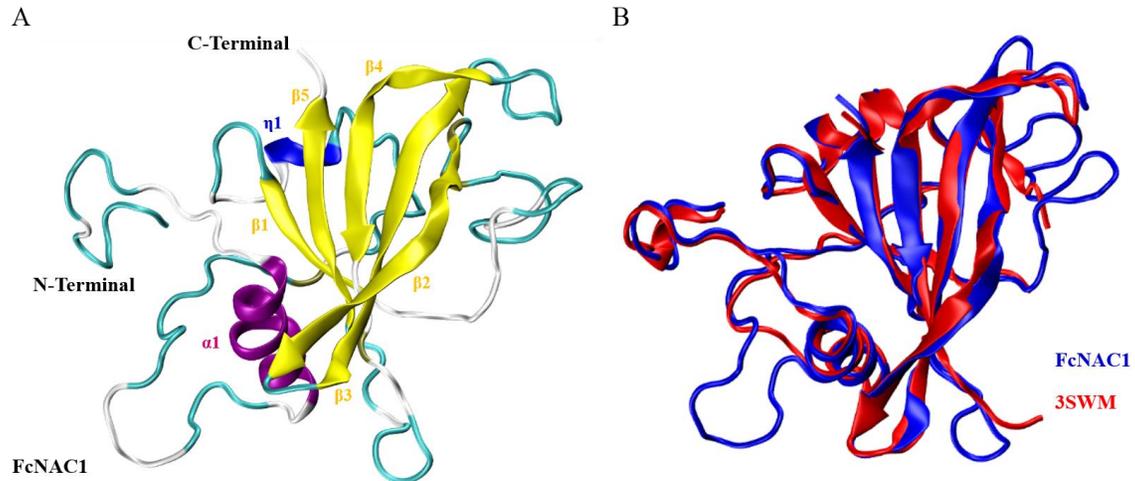


Figura 12. Modelamiento por homología del monómero FcNAC1 y alineamiento estructural con su templado. A) Modelamiento por homología del dominio NAC FcNAC1 mediante el programa MODELLER, donde 50 modelos fueron realizados, donde el mejor fue sometido a minimizaciones de energía y dinámica molecular, con el propósito de relajar la estructura y minimizar impedimentos estéricos en los residuos que componen nuestro modelo. Es posible apreciar la agrupación de sabanas β compactadas por ambos lados por 1 α hélice y 1 corta hélice 3_{10} . α : helices, β : sabanas β , η : hélice 3_{10} . B) Alineamiento estructural entre el modelo relajado FcNAC1 y la cadena A de la estructura cristalográfica 3SWM utilizada como templado. Mediante el uso del programa VMD es posible apreciar el alto grado de conservación de la estructura secundaria. Este alineamiento estructural tiene un RMSD de 2.5 Å respecto a los carbonos α , donde las zonas que presentan loops son las más variables en cuando a su posicionamiento.

Luego de obtenida la estructura conformacional que da cuenta del monómero de FcNAC1, se procedió a realizar el modelamiento de la estructura homodimérica de FcNAC1, ya que en la literatura, se describe que estos factores de transcripción presentan la particularidad de poder formar tanto homo como heterodímeros, y con esto, llevar a cabo su función en el reconocimiento de los surcos mayores en zonas promotoras presentes en el DNA (Ernest y cols., 2004). Para tal efecto, el modelamiento de la estructura homodimérica del factor de transcripción FcNAC1, se realizó usando ambas cadenas de la estructura cristalográfica utilizada como templado (cadenas A y B), mediante alineamientos estructurales. La zona de contacto entre las dos homo cadenas presentan la participación de residuos altamente conservados del extremo N-terminal de las proteínas (Fig. 13 A). Para que estos factores de transcripción puedan formar tanto homo como heterodimeros, es

necesario que exista la formación de un puente salino entre residuos Arg y Glu de cada cadena, como describe Zhu y cols., (2014). En nuestro caso tras realizado el modelamiento del homodimero se puede apreciar que los residuos Lys67 y Glu74 de cada cadena presentan esta interacción en la formación de puentes salinos (Fig. 13 B), donde estos residuos también son conservados por las secuencias FvNAC y SND2 (Fig. 5). Cuando se evalúa que estructuras secundarias son las que predominantemente realizan la mediación en la interacción con el DNA, se puede apreciar que son las sabanas $\beta 3$ y $\beta 4$, siendo estos los dominios que permiten el reconocimiento de los surcos mayores en el DNA (Fig. 13 C). Además, es posible apreciar presencia de residuos con carga positiva en estos dominios, los cuales estarían estabilizando la interacción de reconocimiento DNA-proteína, descrito para factores de transcripción por Olsen y cols., (2005). Relacionado al modo de interacción con el DNA de estos factores de transcripción, se describe en la literatura que existe un grado de relación entre las familias de factores de transcripción NAC, WRKY y GCM, donde estos 3 tipos de proteínas comparten una agrupación de sabanas β con similar topología, la cual es responsable de mediar la interacción con el DNA (Welner y cols., 2012), y en nuestro caso, podemos evidenciar que esta interacción proteína-DNA se encuentra en el motivo ubicado entre las sabanas $\beta 3$ y $\beta 4$ del modelo FcNAC1, donde los residuos Lys134 y Lys137, los cuales son altamente conservados, permiten mediar la interacción DNA-proteína (Fig. 13 D).

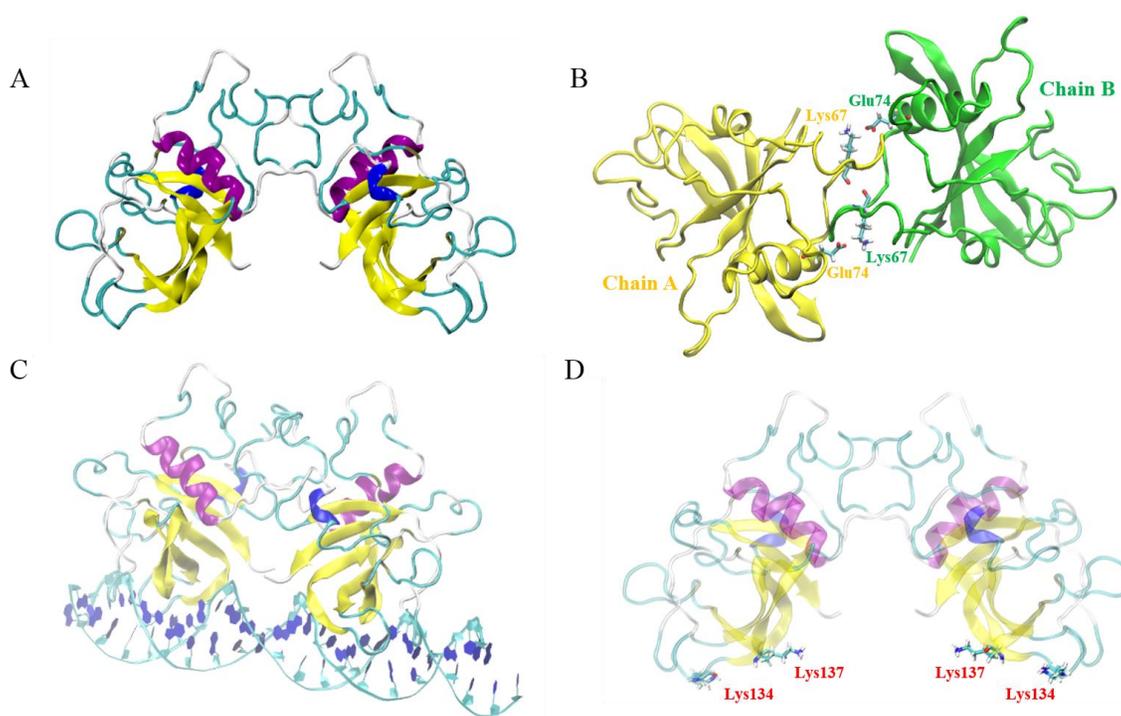


Figura 13. Modelamiento estructural del dominio NAC presente en FcNAC1 como homodimero y su posicionamiento con DNA. A) Conformación estructural de FcNAC1 como homodimero. B) La formación de un puente salino entre Glu74 y Lys67 de cada monómero son cruciales para la dimerización del complejo. C) Posicionamiento de la interacción DNA-Proteína, donde las sabanas β S6 y S7 son capaces de reconocer elementos en *cis* en el surco mayor, permitiendo así esta interacción. D) Posicionamiento de la interacción DNA-Proteína con énfasis en residuos con carga positiva, los cuales permiten la interacción entre el factor de transcripción y el DNA.

4. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha logrado caracterizar una secuencia de cDNA que presenta homología con miembros de factores de transcripción de la familia NAC, la cual posteriormente fue anotada como *FcNAC1*. Esta secuencia presenta, a nivel amino acídico, el dominio característico de la familia NAC, subdividido en sus 5 sub dominios y una extensión de la región amino terminal. Mediante análisis filogenéticos fue posible determinar que *FcNAC1* agrupa con miembros de la familia NAC relacionados a la remodelación de pared celular (SND2). *FcNAC1* presenta niveles de expresión diferencial durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto de *F. chiloensis* sugiriendo un potencial rol en el proceso de desarrollo y maduración de estos mismos. A su vez, fue posible determinar la localización sub-celular del factor de transcripción *FcNAC1*, realizado mediante transformación transitoria evidenciado que esta proteína se encuentra en el núcleo. Ensayos funcionales de transactivación transcripcional en plantas de tabaco, permitió evidenciar que *FcNAC1* es capaz de reconocer y transactivar parte de la secuencia promotora del gen *Pectato liasa (FcPL)*, como homodímero. Esto nos permite hipotetizar que *FcNAC1* podría estar relacionado con el proceso de remodelación de la pared celular durante el ablandamiento de frutos de frutilla chilena blanca, pudiendo cumplir un rol importante relacionado al metabolismo de las pectinas. El análisis de la estructura tridimensional de *FcNAC1* permitió evidenciar que la estructura secundaria del dominio NAC es altamente conservada, que la formación de un puente salino entre residuos Lisina y glutamato permiten la homodimerización de este factor de transcripción, facilitando que este cumpla su función de reconocimiento de los surcos mayores en el DNA y que este dominio de interacción con el DNA se encuentra favorablemente conformado por residuos de carga positiva. Esta información nos permite pensar que *FcNAC1* podría tener un rol activo en el proceso de ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*. Finalmente, la información descrita en este capítulo provee de un potencial regulador del proceso de maduración y ablandamiento, permitiendo contribuir a entender de mejor manera la red regulatoria relacionada al desarrollo y maduración en *F. chiloensis*.

CAPÍTULO 2

Estudio de la modulación de la expresión génica del gen *FcNAC1* mediante tratamientos hormonales en fruto de *Fragaria chiloensis* y análisis *in-silico* de su secuencia promotora.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de maduración frutal es un evento genético, finamente orquestado, altamente coordinado e irreversible, el cual involucra una diversidad de modificaciones bioquímicas, fisiológicas y organolépticas que desencadenan en el desarrollo de un fruto apto para el consumo con atributos de calidad deseables por el consumidor (Prasanna y cols., 2007). En general, los frutos presentan durante el proceso de maduración, modificaciones similares entre ellos: cambios en su coloración, textura, sabor, aroma y también susceptibilidad a ataques por patógenos. En estas modificaciones se ven involucrados diferentes reguladores del crecimiento u hormonas, tales como giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, auxinas, brasinoesteroides y ácido jasmónico, de los cuales, se describe que cumplen sus funciones actuando en bajas concentraciones para regular tanto el crecimiento como el desarrollo celular (Perkins-veazie y Huber, 1992).

Estas modificaciones son coordinadas de forma distinta entre dos grandes grupos de frutos, los cuales se dividen en los llamados frutos climatéricos que dependen de un aumento en su tasa de respiración comandado por etileno y los frutos no climatéricos, donde etileno no tiene la misma preponderancia (Giovannoni, 2001). Los frutos que presentan características de ser del tipo climatérico como tomates, paltas, bananas, manzanas, entre otras, se caracterizan por mostrar un incremento en la biosíntesis de etileno conjuntamente con un incremento de su tasa respiratoria. En contraparte, los frutos concernientes al grupo de los no climatéricos, entre los que podemos mencionar a uvas, cítricos y frutillas, no presentan este incremento en su tasa respiratoria y sus niveles de etileno son basales (Alexander y Grierson, 2002)

Entendemos como maduración, a la sumatoria de los cambios tanto fisiológicos como bioquímicos que experimenta un fruto en los últimos estadios de desarrollo, lo cual genera que adquiera los atributos y condiciones para ser atractivo al consumidor. Estas modificaciones, en especies de *fragaria* como el caso de *fragaria x ananassa* reportado por Symons y cols. (2012), estarían relacionadas a cambios hormonales durante el desarrollo del fruto donde se propone que ácido abscísico presentaría un rol importante, aumentando

sus niveles a medida que transcurre el desarrollo del fruto y auxinas decaerían concomitante al proceso de maduración del fruto (Symons y cols., 2012).

Es reportado en la literatura que la expresión de factores de transcripción NAC, es regulada por diversos factores, entre ellos, señales hormonales. Como ejemplos de estos podemos mencionar los genes *ANAC019*, *ANAC055* y *ANAC072*, los cuales presentan distintos grados de expresiones diferenciales al ser tratados con las hormonas tales como ácido abscísico y metil jasmonato (Tran y cols., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que el gen *VNI2* integra la vía de señalización por estrés abiótico mediado por ácido abscísico (Yang y cols., 2011). Referente a factores de transcripción NAC presentes en especies diferentes de *A. thaliana*, podemos mencionar que tasas transcripcionales diferenciales moduladas por ácido abscísico han sido reportadas en *Zea mays* (Lu y cols., 2012), *Glycine max* (Hao y cols., 2011) y *Solanum lycopersicum* (Zhu y cols., 2014).

A la fecha no existe información sobre la regulación hormonal de factores de transcripción NAC en frutilla chilena, pero existe información sobre miembros de la familia NAC relacionados a diferentes tipos de estrés como: (calor, frío, salinidad, agua, heridas, insectos y/o patógenos, metil jasmonato y ácido abscísico) en diferentes especies como: *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Brassica napus*, *Zea mays*, *Sugarcane*, *Petunia hybrida* y *Citrus sinensis*, donde se describe que la presencia de elementos en *cis* en las secuencias promotoras de estos factores de transcripción producen variaciones en sus perfiles transcripcionales (Zhu y cols., 2014). En este capítulo se propone comprender la relación en la modulación de expresión del gen por hormonas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal.

Frutos de *F. chilensis* fueron colectados desde un huerto comercial en la ciudad de Contulmo, región del BíoBío, Chile (latitud 38°04'8.6''S, longitud 73°14'2.96''W). Posteriormente, se procedió a realizar la clasificación de la fruta de acuerdo a su peso y color del receptáculo y achenio, como se describe en Figueroa y cols., (2008). El estadio de maduración que fue utilizado para realizar los tratamientos hormonales fue C2 (receptáculo verde y achenios rojos), siguiendo lo descrito por Opazo y cols., 2010.

2.2 Tratamientos Hormonales.

2.2.1 ABA.

Frutos de *F. chilensis* pertenecientes al estadio de maduración C2 (receptáculo de color verde y achenios rojos), fueron dispuestos en dos grupos de 24 frutos cada uno. Se procedió a tratar los frutos del primer grupo con una solución 1 mmol L⁻¹ de ABA (ácido abscísico) (Phytotechnology Lab) diluida en una solución tampón 0,06 mmol L⁻¹ de ácido cítrico, 0,074 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄, 5 mmol L⁻¹ DTT y 2% (v/v) de DMSO (pH 4,5). Los frutos del primer grupo fueron sumergido por 10 minutos en la solución de conteniendo ABA y los frutos del segundo grupo fueron sumergidos durante el mismo tiempo sin ABA. Para evitar el proceso de deshidratación de la fruta, el pedúnculo de cada fruto fue dispuesto en un tubo eppendorf con agua destilada. Posteriormente, la fruta fue dispuesta en el mesón a 20° C y se procedió a realizar colectas en 4 tiempos, 0 hora (que corresponde al grupo de frutos inmediatamente después de sumergir), 1 hora, 2 horas y 12 horas. Los frutos que fueron colectados se procedió inmediatamente a congelar con nitrógeno líquido y fue almacenada a -80° C hasta su utilización.

2.2.2 Auxina.

Para el tratamiento de los frutos con auxina (ácido naftalen acético, ANA, Sigma), se procedió a formar dos grupos de 24 frutos del estadio de maduración C2 cada uno. Los frutos del primer grupo fueron sometidos a un tratamiento con 1 mmol L⁻¹ de auxina sintética (ácido naftalen acético, ANA). Cada fruto del primer grupo fue sumergido durante 10 minutos en la solución tampón descrita en el punto (2.2.1) conteniendo la auxina sintética y los frutos del segundo grupo fueron inmersos durante 10 minutos en la solución sin la hormona, como controles. Para evitar la deshidratación, el pedúnculo de cada uno de los frutos fue sumergido en un tubo de microcentrifuga conteniendo agua destilada. Posteriormente los frutos fueron dispuestos en el mesón a 20° C, realizándose colectas de frutos en 4 tiempos, 0 hora (que corresponde al grupo de frutos inmediatamente después de sumergir), 1 hora, 2 horas y 12 horas. Los frutos colectados fueron inmediatamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80° C hasta su posterior uso.

2.3 Extracción de DNA genómico.

Se procedió a realizar una extracción total de DNA genómico a partir de hojas jóvenes (200 mg) de plantas de *F. chiloensis*. Este material fue homogenizado en mortero mediante nitrógeno líquido. A cada una de las muestras se les agregó 800 µL de solución tampón de extracción (previamente incubada a 65° C), la cual está compuesta de 3% CTAB (p/v), 2% v/v de PVP, 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 2 % (v/v) β-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 65° C con agitación suave, luego se les agregó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v), mezclando por inversión se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó un volumen de isopropanol, para posteriormente incubar por 2 horas a -20° C. La suspensión fue centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos y el pellet obtenido fue secado y disuelto en 100 µL de agua ultra pura a 65° C. Luego se agregó 1 mL de solución de RNAsa (10 mg mL⁻¹) y se incubó por 15 minutos a 37° C. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v) y 100 µL de fenol y esto fue centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue

precipitado con 2,5 volúmenes de etanol a -20°C por 2 horas y centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. El pellet obtenido fue secado y diluido en 35 μL de agua ultra pura a 65°C . Fue evaluada la integridad del DNA genómico por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) el que fue visualizado haciendo uso de Gel RedTM.

2.4 Obtención de la secuencia promotora del gen *FcNAC1*.

Fragmentos de la región promotora del gen *FcNAC1* fueron clonadas desde DNA genómico de *F. chiloensis* haciendo uso del kit BD GenomeWalkerTM Universal (Clontech). Para lo cual se procedió a realizar 4 librerías, a través de la digestión del material genómico con las enzimas de restricción DraI, EcoRV, PvuII y StuI, posterior a la purificación del DNA e incorporación de los adaptadores, siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Las librerías fueron empleadas para amplificar las regiones río arriba de la secuencia conocida de *FcNAC1* haciendo uso de los siguientes partidores: FcNAC1-GW1 (5'-CCTCTCTTCTTCCTCTTCCTCATCTG-3'), FcNAC1-GW2 (5'-GCAGAGGAGGGAGTTATTGACTGAAC-3'), FcNAC1-GW3 (5'-CTATAGGGTGGCCACAAGACG-3') y FcNAC1-GW4 (5'-GAGTGGATGAAGCTTTCTGGTATC -3') y se hizo uso del primer partidor incluido en el kit (AP1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC) siguiendo el protocolo de PCR enunciado a continuación: 7 ciclos de 94°C por 25 seg, seguido por 72°C por 3 min, seguido de 32 ciclos de 94°C por 25 seg, posteriormente 62°C por 3 minutos y 1 ciclo de 62°C por 10 minutos. Para esta reacción de PCR fue empleada la enzima polimerasa Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) de acuerdo a las instrucciones descritas en el kit. Posteriormente se procedió a realizar un PCR anidado haciendo uso de los mismos partidores mencionados anteriormente (FcNAC1-GW1, FcNAC1-GW2, FcNAC1-GW3 y FcNAC1-GW4) y el segundo partidor incluido en el kit (AP2: 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT -3'), haciendo uso del siguiente programa de PCR: 5 ciclos de 94°C por 25 segundos, 72°C por 3 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 25 segundos y 62°C por 3 minutos y un ciclo final de 62°C por 7 minutos.

Posteriormente, los productos obtenidos fueron purificados desde el gel de agarosa, mediante el uso del kit Ultra Clean 15 Purification kit (MO BIO Lab. Inc.). Se procedió luego a realizar el clonamiento de las bandas obtenidas en el paso anterior en el vector pGEMT-Easy (Promega), donde la ligación fue realizada siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La transformación de células competentes DH5 α con los vectores pGEMT-Easy y nuestros fragmentos se realizó por transformación por shock térmico, para posteriormente plaquear las células en medio LB-AGAR suplementado con Ampicilina (100 mg/mL), X-Gal (50 mg/mL) e IPTG (800 mM) a 37° C, durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó la verificación de las colonias transformadas mediante PCR haciendo uso de los partidores específicos T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') y SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') haciendo uso del siguiente programa de PCR: 1 ciclo de 94° C por 10 minutos; 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos y 72° C por 1 minuto, finalmente un ciclo de 72° C por 10 minutos. Las colonias positivas con los fragmentos de interés fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con Ampicilina (100 mg/mL) a modo de mantener constante la presión selectiva por el antibiótico, fueron crecidas por toda la noche con agitación a 37° C. Al día siguiente, las células fueron sometidas a centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, para posteriormente realizar purificaciones plasmidiales utilizando el kit E.Z.N.A Plasmid Miniprep System (Omega Bio-Tek), siguiendo las descripciones establecidas por el proveedor. Los vectores fueron secuenciados por la empresa Macrogen, Inc. (Seúl, Corea).

2.5 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

Las secuencias obtenidas post secuenciación, fueron analizadas y ensambladas con la secuencia conocida de *FcNAC1* mediante el uso del programa CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). El análisis *in-silico* de los elementos regulatorios en *cis* relacionados a respuestas hormonales presentes en la secuencia promotora del gen *FcNAC1* fue realizada haciendo uso de la herramienta PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Rombauts y cols., 1999). Para los elementos en *cis* de reconocimiento por factores de transcripción NAC se utilizó el

programa PlantPAN2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter.php>) (Chow y cols., 2016).

2.6 Análisis de la expresión génica del gen *FcNAC1* de frutos con tratamientos hormonales por qRT-PCR.

Extracciones de RNA total fueron realizadas a partir de un pool de (2 g) de frutos de *F. chiloensis*, mediante el método CTAB. Posteriormente, el RNA obtenido se procedió a ser tratado con DNasa I (Fermentas) y limpiado con RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Haciendo uso de 2 µg de RNA total limpio de DNA genómico, se sintetizó cDNA de hebra simple mediante el uso del kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Se consideró utilizar tres replicas biológicas por cada grupo experimental. Se utilizaron los partidores específicos descritos en materiales y métodos del capítulo I:

Gen	Partidor (forward/reverse)	Amplicon (bp)	Eficiencia (%)
<i>FcNAC1</i>	5'-TGGTATGAGCGGCCTCAG -3' 5'- GCTGCCCTCTCTTCTTCCTC -3'	101	96
<i>FcGAPDH</i>	5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' 5'-AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG-3'	132	93

Utilizando a *FcGAPDH* como control interno. Se utilizó el kit Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) para las reacciones de amplificación, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, en un volumen de 20 µL de reacción final que contuvo 8 µL de H₂O, 1 µL de Mix de partidores específicos a una concentración final de 5 µM cada uno, 10 µL de SyberGreen (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix 2X, Fermentas) y 2 µL de cDNA diluido en ¼. Para este análisis fue empleado un termociclador Opticom-2 Real Time PCR System (MJ Research, WaterTown, MA).

Cada una de las réplicas biológicas fue concerniente a una extracción independiente de RNA desde un mix o *pool* de frutos o tejidos vegetativos. Para la reacción de PCR fue

implementado el siguiente protocolo: 94° C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de 94° C por 15 segundos, 57° C por 15 segundos y 72° C por 20 segundos. Posterior a esto, se realizó la curva de disociación denaturando las muestras por 1 minuto a 95° C, 55° C por 1 minuto y luego aumentando la temperatura en 0,5° C cada 10 segundos empezando de 55° C hasta alcanzar los 95° C. Para las puntuaciones de Ct (*threshold cycle*) se consideraron el valor promedio de las tres replicas biológicas y las dos replicas técnicas. Los valores fueron normalizados usando los valores de Ct obtenidos para el gen de referencia *FcGAPDH*, gen el cual no muestra diferencias en sus niveles de expresión en los distintos tejidos utilizados (Pimentel y cols., 2010).

2.7 Análisis estadístico.

Para todos los análisis génicos de expresión relativa, se empleó un diseño al azar con tres replicas. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS v.14. Los análisis de varianzas (ANOVA) fueron realizados con un nivel de significancia determinado con un valor $p \leq 0,05$ usando el test (LSD) Fisher para los análisis de expresión tanto de fruto y tejido vegetativos.

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de la secuencia promotora de *FcNAC1* y análisis *in-silico* de sus elementos en *cis* relacionados a respuestas hormonales y a miembros de la familia NAC.

Luego de obtenida la secuencia cDNA de nuestro factor de transcripción, nos propusimos realizar la obtención de la secuencia nucleotídica que comprende el promotor del gen *FcNAC1*, con la finalidad de poder entender las bases moleculares que subyacen al proceso de maduración frutal en frutilla chilena y comprender sobre el perfil de expresión transcripcional del gen *FcNAC1*. Para tal efecto, diseñamos bibliotecas de DNA genómico proveniente de hojas jóvenes de *F. chiloensis*, las cuales fueron usadas para realizar la técnica Genome Walker y obtener secuencias correspondientes a la región río arriba de nuestro gen de interés. En este análisis fue posible encontrar un fragmento de 1488 pb, el cual es la secuencia río arriba del codón iniciador (ATG) del gen *FcNAC1* (Fig. 14).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGGTGGCTTCGCCAGAGGCTAGCTGCTCGTTCATATATATGCAGATCGATCTCATATACGGCGCAGTTATCCTCTACACAACAA

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTCGTATTCCTTGCATAGAACAGTCCAAGTGGCATAGATATTGACGTGGCTCGTGCCTGATTGGTAGGGTAAGCTTCTTGAGGAAG

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAACCTAAAGACTGGCTACGTACGTAGGTACGTATACGACGGTGGACGATATCGTAGTCGTGCCTAAAGCTAAAAGTGACATGTAT

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGATCGATTAATAAATTCCTGTCAATAAACGAGGATTCATAATTCATACCAAGATTGATAGCTTTCATGCAATGGATTGAATG

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGATTAATTAAGATACACTCTTTATTAGTTGTTTTGTTTAGTTCAATTTATATAAAATTTCTTGAACCTCAATCTTGGACAATACGTATCT

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTCGACCGTAATATTGCTCTTCGAGATTAAGATAAAAGCTTACAAAATATTGAAAATAGAAATTTGGAGCAGACATAGAGCATTTTAT

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGAAATTTCCAACCACTAATGTGTATGTTCTTAATTAATTTGATTCCATATTTTATACATATATTCGTATGGGAGAAAGAGAAAGACAGT

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATCGATTCTTGGCTTGGGATTAGAAGTCTACGTGAAGAAAAGAGAGAAAAATGGGGAATATACAACAAGGTAGCTAGGTTGGTATAG

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATGGTATCAAATAACTTCCTCCAAATATGCAACAATGTTGGCTCGTACGTATGTGCTTATAAACTTGTACACTATATACCATATC

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTTAGGGACTCTAGGTTGACACTGCAGCTAAAGCCTCAAAGAGGTAACAAGCTCTCCAGAGAATCACCTATATATGTTGCCCTTCT

      910     920     930     940     950     960     970     980     990
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCACTTAACCCCTACCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGAAAATATAAATGAGGGTCTTGTCTTTTTTCGATAACAATAATTAGG

      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTTTGTTTTGCTCTTCGCCACAAGTTAAACCTTGTTTAGTATTACGTGGGAAAGAAGAAGAAGAAAATATACCTGGCCAATA

      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAAACCGCCGACACCGTTTCTCTGATCCGAGCGGTACACGCAAGACAAACAAATTAACCTGCCCTGCAAGCAACCTAATACTATT

      1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTAGAAATTCCTTGTCTAGATTTCTTTATATATAAAGTTGAGCTTACTCCCTAGCCTTGTCTTCTAATTACTTCTCTCTGGATC

      1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTCTTTGAAAGATTAAACCTCTGATGGTGAAGCAGACTGGTTAAGGAAAACGTGCTCGAAAAGCGACGGTTGGCTTGGCTTAAAGA

      1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAAGGACCTCTGAGATCGAGTTTGGGAAATTTATATAGAAAAGAAAGGTGGAGAAATAGCGAGAAACCAATTTGGGCTCTGGTATGAG

      1450    1460    1470    1480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGGCCTCAGAAAAATCAAGCAGCGCAGAGAAGGATCAGATCAGCAGC

```

Figura 14. Secuencia nucleotídica promotora río arriba del codón iniciador ATG del factor de transcripción *FcNACI*.

Se realizó un análisis bioinformático, posterior a la obtención de la secuencia promotora de *FcNAC1*, haciendo uso de la base de datos en línea PlantCARE. Ello, con el objetivo de encontrar elementos de respuesta a señales hormonales. Los resultados obtenidos en este punto se muestran esquematizados en la figura 15, donde es posible evidenciar la presencia de elementos en *cis* relacionados a señales hormonales.

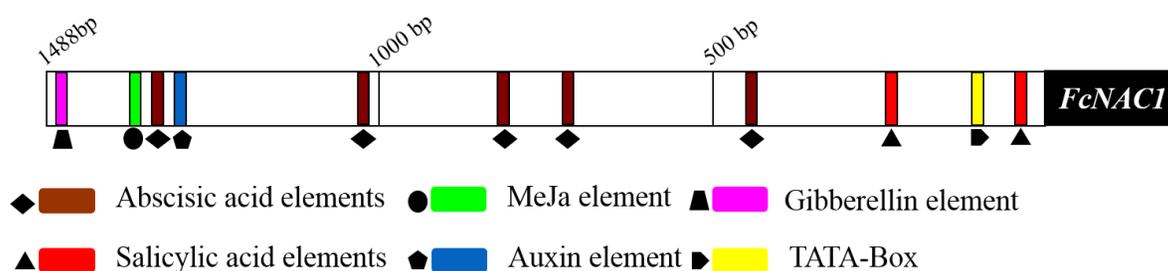


Figura 15. Secuencia nucleotídica promotor del factor de transcripción *FcNAC1*. Destacado con diferentes formas y colores son representados esquemáticamente los elementos de respuesta a señales hormonales encontrados en la secuencia promotora del gen.

Entre los elementos encontrados en la región promotora de *FcNAC1* se encuentran: 5 elementos relacionados a ácido abscísico (ABRE), 1 relacionado a metil jasmonato (CGTCA), 1 relacionado a giberilinas (GARE), 2 relacionados a ácido salicílico (TCA) y 1 relacionado a auxinas (TGA). Además, fue posible evidenciar la presencia de una caja TATA, la cual se encuentra cercana al codón inicial ATG. En la tabla 2 se pueden evidenciar más detalles de los elementos en *cis* encontrados en la secuencia promotora de *FcNAC1*.

Tabla 2. Elementos regulatorios en *cis* que fueron identificado en la región promotora de 1488 pb del gen *FcNAC1*.

Motivo	Función	Hebra	Secuencia
ABRE	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a ácido abscísico	+	ACGTGGC
ABRE	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a ácido abscísico	+	TACGTG
ABRE	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a ácido abscísico	+	TACGTG
ABRE	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a ácido abscísico	-	TACGGTC
ABRE	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a ácido abscísico	-	GACACGTACGT
CGTCA-motif	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a Metil Jasmonato	-	CGTCA
TGACG-motif	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a Ácido Salicílico	+	TGACG
TCA-element	Elemento en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a Ácido Salicílico	+	CAGAAAAGGA
TGA-box	Element en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a Auxina	+	TGACGTGGC
GARE-motif	Element en <i>cis</i> envuelto en la respuesta a Giberilinas	+	TCTGTTG
TATA-box	Elemento central del promotor alrededor de -30 bp desde el ATG	+	TAATA

Durante el proceso de desarrollo del genero *fragaria*, se describe en la literatura que las concentraciones endógenas de auxinas decaen cercano al proceso culmine de maduración frutal, y a su vez, las concentraciones de ácido abscísico incrementan a medida que transcurre la maduración (Symons y cols., 2012). Conjuntamente con lo anteriormente mencionado, existe evidencia en la literatura que describe el papel crucial que cumple ácido abscísico en el proceso de regulación de la maduración en frutos de frutilla, donde al realizar aplicaciones exógenas de esta hormona es posible promover la maduración de estos berries (Jia y cols., 2011). Se encontró elementos en *cis* de respuesta a ácido abscisico y un elemento relacionado de respuesta a auxinas, ello, permitiría hipotetizar la existencia de algún grado de relación entre estas señales hormonales y la variación en la expresión del gen *FcNAC1* durante el proceso de desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*.

Se describe en la literatura que los SWNs (Secondary Wall NACs) son factores de transcripción considerados como reguladores maestros de la biosíntesis de pared celular, lo cual provee una herramienta sin precedente para poder investigar como el programa de biosíntesis de pared celular es transcripcionalmente activado, además, es mencionado que los SWNs cumplen con la función de regular un número amplio de factores de transcripción (Oda y cols., 2012). A su vez, existe información que demuestra que los SWNs reconocen e interaccionan con secuencias consenso, palindrómicas imperfectas de 19 pb, las cuales han sido denominadas como SNBEs (Secondary NAC Binding Elements) y mutaciones en cualquiera de los nucleótidos conservados en las secuencias SNBEs causan la pérdida de unión con los factores de transcripción SWNs (Zhong y cols., 2010).

Cuando se realizó el análisis de la secuencia promotora de *FcNAC1* con el programa Plant Pan 2.0, fue posible identificar la presencia de elementos de respuesta a la familia NAC, del tipo SNBEs, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de prácticamente toda la secuencia promotora de *FcNAC1* (Fig. 16 A). Cuando se analizó las secuencias concernientes a los SNBEs con el programa MEME, fue posible apreciar que estas generan una secuencia consenso, la cual se muestra en la figura 16 C.

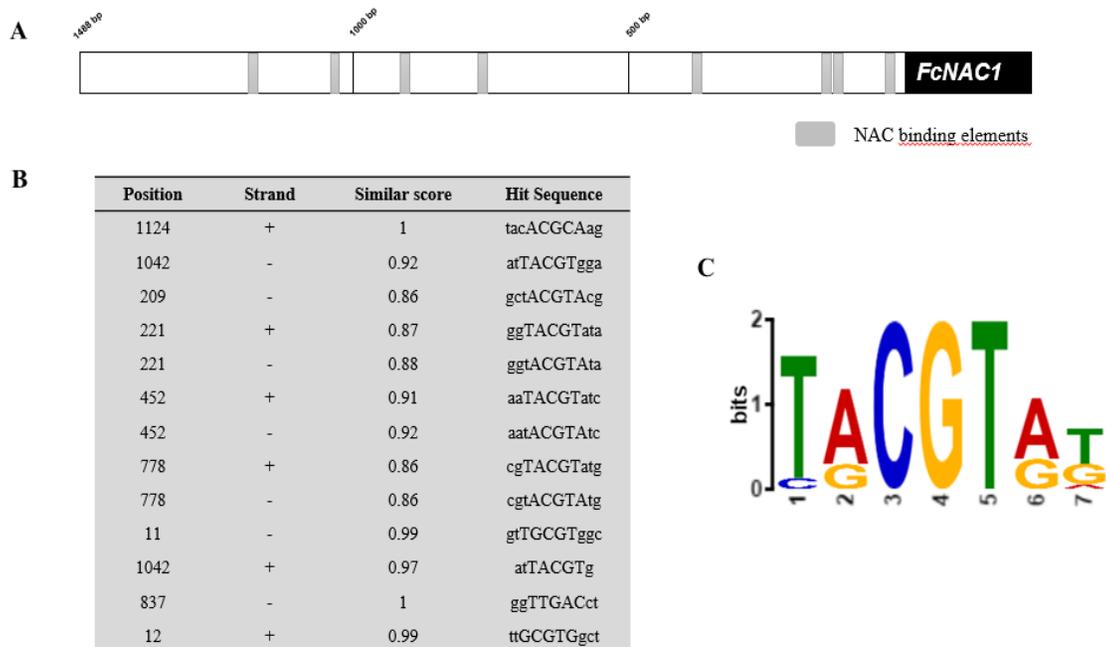


Figura 16. Secuencia promotora del gen *FcNAC1* y análisis *in-silico* de elementos *in-cis* relacionados a miembros de la familia NAC. A) Representación esquemática del promotor *FcNAC1*, el cual fue analizado con la base de datos Plant Pan 2.0. en color plomo son mostrados algunos elementos *in-cis* de interacción con factores de transcripción NAC. B) Tabla con los resultados del análisis de Plant Pan2.0, donde es posible apreciar los diferentes elementos de respuesta a NAC, su secuencia y posicionamiento. C) Logo representativo de elemento de respuesta a NAC (NACBS) el cual fue realizado con el programa MEME.

Factores de transcripción relacionados a la biosíntesis de pared celular o SWNs son capaces de promover la expresión de diversos factores de transcripción, entre ellos, se puede mencionar *SND2*, *SND3*, *MYB46*, *MYB103*, *MYB85*, *MYB52*, *MYB54*, *MYB69*, *MYB43*, *MYB20*, y *KNAT7*. Esto promueve la idea de que una red transcripcional que incluye a SWNs y genes blanco posteriores estarían involucrados en la regulación del proceso de biosíntesis de pared celular (Zhong y cols., 2014). Esta activación puede ser llevada a cabo mediante el reconocimiento de secuencias *in-cis* consenso el tipo SNBEs (T/A)NN(C/T) (T/C/G)TNNNNNNA(A/C)GN(A/C/T) (A/T). Estudios haciendo uso del gen reportero *GUS*, muestran que los SWN son capaces de interactuar con las secuencias del tipo SNBE que se encuentran presentes en sus genes blancos y, por lo tanto, promover la expresión en células formadoras de pared celular (McCarthy y cols., 2011). Estos tipos

de elementos en *cis* han sido encontrados en la secuencia promotora de *FcNAC1* (Figura 17, B), conteniendo la secuencia conservada CGT[A/G], la cual está presente en los elementos del tipo SNBE. La interacción entre NACs y estos tipos de motivos han sido reportados en la literatura, mediante el uso de ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) demostrando que las proteínas NAC son capaces de reconocer e interactuar con DNA como dímeros (Olsen y cols., 2005).

3.3 Análisis de expresión relativa de *FcNAC1* en frutos tratados con fitohormonas.

Con el objetivo de poder comprender si la expresión del gen *FcNAC1* es modulada por señales hormonales intrínsecas coordinadoras del proceso de desarrollo y maduración de la frutilla chilena blanca, se diseñó un experimento de tratamientos hormonales de frutos en estadio C2 de desarrollo haciendo uso de las hormonas ácido abscísico (ABA) y auxina sintética (ANA).

Al momento de analizar los datos obtenidos por qRT-PCR fue posible evidenciar que la acumulación de transcritos para *FcNAC1* fue inducida en relación al control, después de 1 hora de tratamiento con ABA, sin embargo, esta inducción fue revertida después de 2 y 12 horas de tratamiento. Por otro lado, el tratamiento de los frutos con ANA, mostraron una reducción estadísticamente significativa, en la tasa transcripcional de *FcNAC1* comparado al control después de 1 hora de tratamiento, siendo ésta reducción mantenida durante el tiempo (Fig. 17).

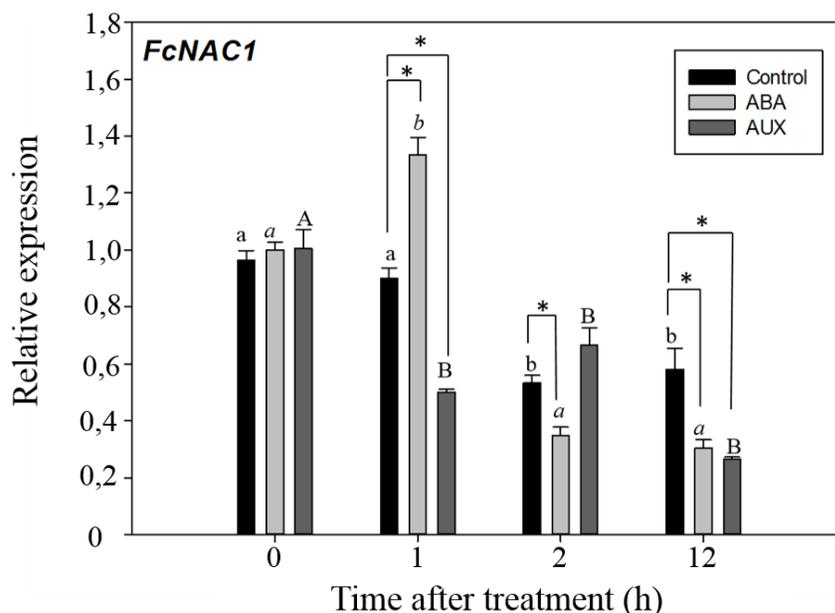


Figura 17. Efecto hormonal en la transcripción del gen *FcNAC1*. Cambios en los niveles de expresión del gen *FcNAC1* en respuesta a ABA y auxinas. Frutos de *F. chiloensis* pertenecientes al estadio C2 fueron sometidos a tratamientos hormonales (1mM de ABA y 1 mM de ANA) y los controles fueron inmersos en buffer sin hormonas (control). Muestras fueron colectadas justo después del tratamiento (10 min), y después de 1, 2 y 12 horas, para luego ser almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores extracciones de RNA mediante el método CTAB. Análisis de expresión fueron realizados a través de qRT-PCR. Para el mismo tratamiento, diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$), durante el tiempo de observación.

En esta línea, es posible encontrar información en literatura relacionada a la modulación transcripcional específica de diversos miembros de la familia NAC por señales hormonales, entre ellas ABA. Así, se ha sido descrito que los genes *ANAC019*, *ANAC055*, *ANAC072*, *RD26*, *RD20*, *ZmSNAC1*, *ANAC2*, *SNAC2*, *OSNAC5*, *OSNAC10*, *DgNAC1*, *CarNAC3*, presentan niveles diferenciales de respuesta ante esta fitohormona, y en algunos casos, no solo presentan respuesta, sino que son parte de la ruta de señalización del ácido abscísico, como es revisado en el trabajo descrito por Nuruzzaman y cols., (2013). Este último punto toma un notorio realce considerando que ABA presenta una importante preponderancia durante el desarrollo y maduración frutal del género *fragaria*. Bajo esta visión, parece llamativo e interesante el que encontremos elementos en *cis* relacionados a respuestas hormonales en el promotor de *FcNAC1* (Fig. 16), y que a su vez, tanto ABA

como auxina fueran capaces de modular la acumulación de transcritos del gen *FcNAC1*, lo cual concuerda con reportes previos descritos en *Arabidopsis* (Jensen y cols., 2010). Finalmente, fue posible determinar un incremento en la acumulación de la tasa transcripcional de *FcNAC1* por ABA y un decrecimiento del nivel transcripcional de *FcNAC1* cuando los frutos fueron tratados con auxinas (Fig. 17). Esto concuerda con comportamientos descritos para miembros de la familia NAC en *Zea mays* (Lu y cols., 2012), *Glycine max* (Hao y cols., 2011) y *Solanum lycopersicum* (Zhu et al. 2014).

4. CONCLUSIONES

En este capítulo fue posible obtener el promotor del gen *FcNAC1* de muestras de DNA genómico de *F. chiloensis*. El análisis bioinformático realizado a la secuencia promotora del gen *FcNAC1* nos indicó la presencia de variados elementos regulatorios en *cis*, los cuales incluyen elementos de respuesta a señales hormonales, entre ellos, ácido abscísico, auxinas, giberilinas, metil jasmonato y ácido salicílico, lo cual entrega un indicio sobre la potencial regulación hormonal del gen de interés. Además, fue posible evidenciar una alta presencia de elementos de respuesta a factores de transcripción de la familia NAC, específicamente elementos en *cis* del tipo SNBEs, infiriendo que posiblemente existe una regulación en la modulación del perfil transcripcional de *FcNAC1* por otros miembros de esta familia, o en su defecto, por él mismo. Finalmente, fue posible apreciar que la modulación transcripcional del gen *FcNAC1* es influenciada por señales hormonales, tras realizar los ensayos con fitohormonas en los frutos en estadio C2, se pudo determinar que ABA presenta un efecto regulatorio positivo en el perfil transcripcional de *FcNAC1* y auxinas presentan un efecto regulatorio negativo en los tratamientos realizados. Esta variación en el perfil transcripcional podría tener su explicación en la presencia de elementos regulatorios en *cis* en la secuencia promotora del gen *FcNAC1*, permitiendo comprender un poco más sobre la expresión diferencial que presenta este gen durante la maduración de los frutos de *F. chiloensis*, ante estos estímulos hormonales.

CAPÍTULO 3

Caracterización y clonamiento de un cDNA que codifica para otro miembro de la familia NAC (*FcNAC2*) y su potencial interacción con *FcNAC1* mediante ensayos funcionales de luciferasa dual.

1. INTRODUCCIÓN

F. chiloensis L (Duch.) presenta características de ser una especie herbácea robusta, la cual es cultivada de forma convencional por pequeños agricultores en una reducida escala. Esta rosácea, en su periodo reproductivo es capaz de generar frutos de un calibre grande para un berrie, los cuales se componen de dos órganos principales: receptáculos de color blanco-rosáceo y aquenios (los cuales son el fruto verdadero) de color rojo en su etapa culmine de maduración. Esta forma botánica, de esta particular especie, ha sido descrita en la literatura como uno de los progenitores genéticos de la frutilla comercial o *Fragaria x ananassa* (Hancock, 1999), la cual es uno de los cultivos de berries más ampliamente cultivados.

El proceso de maduración frutal es una etapa de diferenciación, la cual involucra cambios tanto bioquímicos como fisiológicos que permiten que los frutos presenten sus propiedades organolépticas y que sean deseables por los consumidores. Entre estas modificaciones, podemos mencionar las alzas en acumulaciones de compuestos del tipo azúcares, la producción de compuestos aromáticos, cambios en la coloración y textura de los frutos (Giovannoni, 2001). Concomitante con este último aspecto, se describe en la literatura que existen importantes modificaciones en la composición de pectinas, hemicelulosas y celulosas en las paredes celulares durante el proceso de maduración, lo cual está intrínsecamente coordinado por la acción de diferentes tipos de enzimas, las cuales cumplen sus funciones específicamente en la pared celular (Brummell y Harpster, 2001). Además, se ha descrito que los perfiles transcripcionales y las actividades de enzimas relacionadas a la remodelación de la pared celular como: *EXP2* (*Expansina 2*), *PL* (*Pectato liasas*), *PG* (*Poligalacturonasas*) (Figueroa y cols., 2008) y *XTHs* (*Xiloglucano endo/transglicosilasa Hidrolasa*) (Opazo y cols., 2010) aumentan durante la maduración del fruto, los cuales quizás podrían ser activados por miembros de la familia NAC.

Los genes NACs son pertenecientes a una super familia génica, específica del reino de las plantas, los cuales cumplen con importantes roles y aspectos tanto en el crecimiento como en el desarrollo vegetal (Olsen y cols., 2005). Esta super familia se caracteriza por

contener en su extremo N-terminal el dominio NAC, que es capaz de formar una estructura secundaria, la cual reconoce e interactúa específicamente con DNA (Aida y cols., 1997). En lo que respecta a la zona C-terminal de estas proteínas, se describe la presencia de un putativo dominio de activación transcripcional, el cual es altamente divergente en esta familia génica. *NAM*, proveniente de petunia, fue uno de los primeros genes de la familia NAC en ser caracterizados, del cual se describe que cumple importantes roles en la determinación del posicionamiento de primordios y meristemas (Souer y cols., 1996).

En este capítulo, considerando la poca información que existe a la fecha sobre miembros de la familia NAC en especies frutales, se aisló otro miembro de la familia NAC (*FcNAC2*), diferencialmente expresado en frutos, a partir de cDNA de frutilla chilena nativa. Se caracterizó su secuencia, perfiles transcripcionales y se evaluó su posible interacción con *FcNAC1* en ensayos funcionales, con el objetivo de evaluar si presenta alguna relación con el proceso de remodelación de pared celular durante el desarrollo y maduración de los frutos de *F. chiloensis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención del Material vegetal.

Frutos de *F. chiloensis* fueron colectados desde un cultivo comercial desde la ciudad de Contulmo, región del Biobío, Chile (latitud 38°04'8.6''S, longitud 73°14'2.96''W), siguiendo la clasificación descrita por Figueroa y cols., 2008 (C1, C2, C3 y C4). Además, fueron colectados también muestras referentes a distintos órganos de las plantas, tales como: flores, raíces, hojas, estolones y tallos. Tras estas colectas, fueron removidos cuidadosamente tanto el pedúnculo y el cáliz de cada fruto, cortados en forma longitudinal en dos mitades, congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80° C para su uso posterior.

2.2 Extracción de RNA.

Se procedió a realizar tres extracciones de RNA total independientes, provenientes de los 4 estadios de maduración de los frutos (C1, C2, C3 y C4), a su vez, se realizaron extracciones de RNA de raíces, hojas, estolones y flores, haciendo uso del método CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) con modificaciones menores descrita por Chang y cols. 1993.

Fueron pulverizados de 2 g de tejido congelado por medio de Nitrógeno líquido en mortero frío, para luego dispensar el material molido en un tubo falcon de polipropileno de 50 ml, conteniendo 20 ml de tampón de extracción de RNA (2% (p/v) PVP; 100 mM Tris HCL (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl) mas 2% (v/v) β-mercaptoetanol a 65 °C. Tras incubar por 15 min a 65 °C mezclando por inversión vigorosa cada 5 min, se agregó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclando vigorosamente por inversión. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 25 min a 4 °C. posteriormente, mediante micropipeteo, se recolectó el sobrenadante de la fase superior y se

agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó a 13000 rpm por 25 min a 4 °C. Se recolectó nuevamente el sobrenadante y se agregó ¼ de volumen de LiCl 10 M, mezclando suavemente. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el material precipitado durante la noche fue centrifugado a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. El pellet fue resuspendido con 500 µl de tampón SSTE previamente calentado a 65 °C (1 M NaCl; 10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)), mediante agitación suave. Fue agregado al sobrenadante, 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y fue centrifugado a 12000 rpm por 30 min. Se rescató el sobrenadante y se agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C, se incubó a -80 °C por 30 min. Finalmente, se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet resultante fue resuspendido en 30 µl de agua bidestilada ultra pura.

Se procedió a tratar las muestras con DNAsa I (Fermentas). Fueron tratados 30 µl de muestra de RNA con 1 µl DNAsa I (1 U/ µl) mas 10 µl tampón 10X y agua bidestilada ultra pura para completar un volumen de 100 µl. Se incubó por 30 min a 37 °C y luego se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min. Se rescató el sobrenadante y se agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente mantenido a -20 °C, y se incubó a -20 °C por 2 h. Finalmente, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4 °C y el pellet resultante fue secado a 37° C y se resuspendió en 30 µL de agua bidestilada ultra pura. Se verificó la integridad del RNA a través de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE (5,7% (v/v) ácido acético; 2 M Tris HCl; 100 mM EDTA (pH 8,0) y la concentración de cada una de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro ND-1000 UV (Nanodrop Technologies) y almacenadas a -80°C para futuros ensayos.

2.3 Clonamiento del gen *FcNAC2*, alineamiento múltiple y análisis filogenético.

Tras realizar análisis de datos de RNA-seq construidos a partir de cDNA de frutos de *F. chiloensis* de los distintos estadios de maduración, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (datos no publicados), nos fue posible identificar otro miembro de la

familia NAC diferencialmente expresado en estadios tardíos de maduración frutal. Esta secuencia presentó una alta homología con otros miembros de la familia NAC, lo cual se evaluó mediante el programa BLASTn (NCBI, USA). Esta secuencia presenta su cDNA de largo completo y a posterior será nombrado como FcNAC2. Posteriormente, se realizó el diseño de partidores para obtener el cDNA de largo completo de FcNAC2, haciendo uso de los siguientes partidores: FcNAC2-Full-length-F: 5'-CACCATGGAGAGCACCGACTCGTCTTCC-3' (nosotros adicionamos la secuencia CACC para realizar un clonamiento direccional) y FcNAC2-Full-length-R: 5'-AGAATACCAATTCATCCCCGGAAG-3'. Se realizaron reacciones de PCR haciendo uso de los partidores sintetizados, siguiendo el siguiente programa en termociclador: 1 ciclo inicial de 94° C por 10 minutos; 35 ciclos de 94° C por 1 minuto, 57° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, para finalmente realizar 1 ciclo de 72° C por 10 minutos. Los amplicones obtenidos de estas reacciones, fueron sometidos a purificaciones de blandas y clonados en el vector pENTER™/SD/D-TOPO®, el cual es incluido en el kit pENTER™ Directional TOPO® Cloning (Invitrogen) siguiendo las instrucciones indicadas en el kit. Se procedió a transformar células de *Escherichia coli* (One Shot® TOP10, Invitrogen), las que fueron crecidas en placas de cultivo LB-AGAR, bajo la suplementación del antibiótico Kanamicina (PhytoTechnology Laboratories) en una concentración final de 25 mg/ml. Se chequearon las colonias positivas mediante PCR con los partidores específicos anteriormente mencionados y se realizaron purificaciones plasmidiales haciendo uso del kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific™) y secuenciados estos por Macrogen, Inc. (Korea). Los vectores fueron almacenados a -20° C para posteriores análisis.

Luego de obtenida nuestra secuencia nucleotídica concerniente al cDNA de FcNAC2, realizamos el análisis de la secuencia amino ácida deducida mediante el uso de la herramienta ExpASy translate (<http://ca.expasu.org>). El análisis de similaridad de secuencia entre FcNAC2 y otros miembros pertenecientes a la familia NAC fue realizado haciendo uso de alineamientos locales mediante BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA). Posterior a esto, realizamos alineamientos múltiples de las secuencias amino acídicas mediante el uso de la herramienta web server T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:expresso>). Finalmente, la construcción del árbol

filogenético fue realizado mediante el software MEGA (Version 5.2; <http://megasoftware.net>) (Tamura et al. 2004)), haciendo uso del método neighbor-join con un bootstrap de 1000 réplicas.

2.4 Análisis de la expresión génica.

Con el RNA total obtenido proveniente de un pool de 2gr. de frutos de *F. chilensis* en el punto anterior, mediante el método CTAB, se procedió a realizar tratamientos con DNAsI (Fermentas) y limpiado con RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Considerando 2 µg de RNA total limpio, sin muestras de DNA genómico presentes, se realizó la síntesis de cDNA de hebra simple haciendo uso del kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con modificaciones menores. Se consideraron tres replicas biológicas por cada uno de los grupos experimentales. Se utilizaron los partidores específicos descritos a continuación:

Gen	Partidor (forward/reverse)	Amplicon (bp)	Eficiencia (%)
<i>FcNAC2</i>	5'- CTTGATGGCTAACCCCGTAA -3' 5'- CAGCGCCCTTCTTATTGAGT -3'	161	98
<i>FcGAPDH</i>	5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' 5'-AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG-3'	132	93

Fue utilizado FcGAPDH como un control interno. Para este punto utilizamos el kit Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) para las reacciones de qPCR, siguiendo lo descrito en el protocolo hecho por el fabricante. Utilizamos un volumen de 20 µL de reacción final, la cual contuvo 8 µL de H₂O, 1 µL de Mix de partidores específicos a una concentración final de 5 µM cada uno, 10 µL de SyberGreen (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix 2X, Fermentas) y 2 µL de cDNA diluido en 1/4. Para este análisis utilizamos el termociclador Opticom-2 Real Time PCR System (MJ Research, WaterTown, MA).

Cada una de las tres replicas biológicas utilizadas en estos análisis son provenientes de extracciones independiente de RNA total desde un mix de frutos o tejidos vegetativos. Para las reacciones de PCR en tiempo real, fue seguido el siguiente protocolo: 94° C por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de 94° C por 15 segundos, 57° C por 15 segundos y 72° C por 20 segundos. Posterior a esto, se realizó la curva de disociación denaturando las muestras por 1 minuto a 95° C, 55° C por 1 minuto y luego se aumentó la temperatura en 0,5° C cada 10 segundos empezando de 55° C hasta alcanzar los 95° C. Para las puntuaciones de Ct (*threshold cycle*) fue considerado el valor promedio de las tres replicas biológicas y las dos replicas técnicas, obteniendo un total de 6 puntos por muestra. Los valores fueron normalizados usando los valores de Ct obtenidos para el gen de referencia o calibrador *FcGAPDH*, el cual no muestra diferencias en sus niveles de expresión en los distintos tejidos utilizados (Pimentel y cols., 2010).

2.5 Ensayo funcional de transactivación transcripcional mediante técnica de luciferasa dual.

Fueron utilizados los fragmentos de secuencias promotoras de genes envueltos en la remodelación de la pared celular, *FcPL* (*Pectato liasa* (Gen Bank KC527025); 1038 bp), *FcEXP2* (*Expansina 2* (GenBank KC527027); 847 bp) y *MdPG* (*Poligalacturonasa* (datos no mostrados)). Las primeras dos secuencias fueron sintetizadas y clonadas en el vector pUC57 incorporando sitios de cortes de enzimas de restricción (5' NotI y 3' NcoI para *PL*) y (5' BamHI y 3' NotI para *EXP2*) e insertadas en el sitio de clonamiento del vector pGreenII 0800-*LUC* (Hellens y cols., 2005). Además, fue utilizada la secuencia promotora del gen *FvDFR* (*Dihidroflavonol reductase* (no publicado); 1560bp) como control positivo de la técnica. La secuencia codificante (cDNA) de largo completo de *FcNAC2* y *FcNAC1* (GenBank AKC96459.1) fueron clonadas en el vector pHEX2 bajo el comando del promotor constitutivo 35S mediante la técnica Gateway. Además, utilizamos a los genes *FvMYB10* (GenBank EU155163.1) y *FvBHLH* (Basic hélix loop hélix (no publicado); 1932 bp), los cuales se encontraban clonados en el vector pHEX2 y fueron utilizados como controles positivos de la técnica. El gen *GUS* clonado en el vector pHEX2 bajo el comando

del promotor constitutivo 35S y fue usado como control negativo. Todos los constructos realizados fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens* (GV3101) e incubados a una temperatura de 28° C por 2 días. Posteriormente, se tomaron muestras de 10 µL de bacterias resuspendidas en 10 mL de buffer de agroinfiltración (10 mM MgCl₂, 0,5 µM acetoseringona) a una OD₆₀₀ entre 0,2 y 0,8. Se incubó a 21° C durante 2 horas en agitación. Se procedió a realizar combinaciones de los cultivos celulares e inyectar la cara abaxial de hojas de *N. bentamiana* (6 semanas de crecimiento). Discos de hojas fueron tomados 3 días después de la agroinfiltración y sujetos a ensayos de luminiscencia con el kit DLAR-2 (Targeting Systems, <http://www.targetingsystem.net/>). La relación de la actividad Luc/Ren se midió usando el equipo Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection System, <http://www.titertekberhold.com/>) como reporta Esplay y cols, 2009.

2.7 Análisis estadístico.

Se empleó un diseño al azar con tres replicas para los análisis génicos de expresión relativa. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SPSS v.14. Los análisis de varianzas (ANOVA) fueron realizados con un nivel de significancia determinado con un valor $p \leq 0,05$ usando el test (LSD) Fisher para los análisis de expresión tanto de fruto y tejido vegetativos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de la secuencia de largo completo del factor de transcripción FcNAC2.

En el laboratorio de fisiología y biotecnología vegetal, se ha trabajado desde un tiempo a esta parte, en poder comprender los aspectos tanto fisiológicos, bioquímicos y moleculares que subyacen al proceso de desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*. En este sentido, se han descrito importantes participantes génicos que modulan y coordinan estos procesos. En esta línea, se han realizados ensayos de secuenciación masiva de muestras de RNA provenientes de los distintos estadios de desarrollo y maduración frutal, logrando obtener librerías de RNA-seq, que nos ha permitido indagar en mayor profundidad sobre genes diferencialmente expresados que podrían estar potencialmente regulando estos interesantes eventos durante el desarrollo y maduración frutal.

Cuando se realizó el análisis bioinformático de las librerías obtenidas por RNA-seq de frutos de *F. chiloensis*, se pudo evidenciar la presencia de otro factor de transcripción con una alta similitud a miembros de la súper familia NAC. Tras este hallazgo, se propuso obtener la secuencia de largo completo que da cuenta del factor de transcripción FcNAC2. Para tal efecto, se diseñaron partidores para amplificar mediante PCR el ORF completo de FcNAC2 y realizar el clonamiento de este en el vector pENTERTM/SD/D-TOPO[®]. Posteriormente, se secuenció y analizó para corroborar la información presente en las librerías de RNA-seq. La secuencia nucleotídica que da cuenta de FcNAC2 contiene un total de 1041 pb (Fig. 18).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGGAGAGCACCCGACTCGTCTTCGGGCTCGCAGCAGCCGCCGCCGAGCCAAACCTACCGCCGGGATTCCGCTTCCACCCACCGATGAG

     100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGCTAGTCGTTCACTCAAGAAAAGGCCTCCTCGGCTCCCTCCAGTTGCCATCATCGCCGAAGTCGACCTCTACAAATTCGAT

     190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCATGGCAGCTCCCAGAAAAGCGGACGTTCCGGAGAGCAAGAGTGGTATTTTTTCAGTCCTAGAGACCGGAAGTACCCGAACGGAGCACGG

     280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTAATAGAGCAGCGACTTCAGGATATTGGAAGGCGACCCGGAAGTACCAAGCCGGTTTTTAGTACTACTGATGAGGGAGGTGGGGTACT

     370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGGAAAGTTGGGGTGAAAAAGCACTTGTCTTCTACAGAGGAAAGCCCAAAAGGAATCAAACCAATGGATCATGCATGAGTATAGG

     460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTGCTGATAACAACACAAGTAACAAGCCACCCCTGGGTGTCATGACTTGGGTAAACAAGAAGAACTCCTTAAGGCTTGATGATTGGGTG

     550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTTTGTCGAATTTACAAGAAGAACAACACGCATAGGCCGATGGATCTGGAGGACTCCATGGACGGCACGATGGGATCGTCTTTCCCTG

     640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCGAAGCTGCACCACCTTCCCCGAAATCGACGACATCAACCTACGGCCAATTCATGGACAACGACCATAATTTCTACGACGGGATGGTA

     730     740     750     760     770     780     790     800     810
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCAGCGAAGGGATCAATACTAGTGCTTCTTTCTTCCAACCTCGGCTTTGGCCAACAGCTCTCTCCCTCTAAAACGGGAAGTCCCGAAT

     820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGTACTGGAATCATGATCCGGAGGACGAAGCAGGGCCTTCAAGGAGACTACACATGGACAGCAGTGATCAGAGCACTGGAAATGGTTCT

     910     920     930     940     950     960     970     980     990
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATTGCCATTCGCTTCTCAGCTCCCTCAGACACCTCCATTGCACCAGCAGCCAATGCTGGGGACGTCACAGCTCGGTGGCGACGGT

    1000    1010    1020    1030    1040
.....|.....|.....|.....|.....|
CTGTTTCGTAGTACACAGTATCAACTTCCGGGGATGAATTGGTATTCCTAG

```

Figura 18 Secuencia de largo completo obtenida para *FcNAC2*.

Luego de obtener la secuencia a nivel nucleotídico concerniente a *FcNAC2*, se realizó el análisis usando herramientas bioinformáticas disponibles en línea. Se utilizó la base de datos no redundante de NCBI BLAST (blastn), donde se determinó que *FcNAC2* presenta un alto porcentajes de identidad con genes codificadores de factores de transcripción, miembros de la súper familia NAC, entre los cuales podemos mencionar: *Fragaria vesca* (99%) (N° accesión XM_004291620.2), *Mulus hupehensis* (85%) (N° accesión KF198116.1), *Pyrus x bretschneideri* (85%) (N° accesión XM 009336347.2), *Malus domestica* (84%) (N° accesión NM 001294055.1) y *Vitis vinífera* (79%) (N° accesión XM 002284618.4).

contienen el dominio NAC (Olsen y cols., 2005). La región C-terminal de las proteínas NAC, son altamente divergentes entre los miembros de esta súper familia (Ooka y cols., 2003) y se describe que esta razón los hace responsable de las distintas diferencias en sus actividades transcripcionales de estas proteínas (Xie y cols., 2000; Yamaguchi y cols., 2008; Jensen y cols., 2010). La región C-terminal divergente de las proteínas NAC generalmente operan como dominios funcionales, actuando tanto como activadores de la transcripción, o en algunos casos, como represores de la misma (Tran y cols., 2004; Hu y cols., 2006; Kim y cols., 2007). AtNAM, ATAF1, AtNAC2 y AtNAC3 han sido reportados como activadores transcripcionales de la expresión génica en ensayos realizados en levaduras (He y cols., 2005).

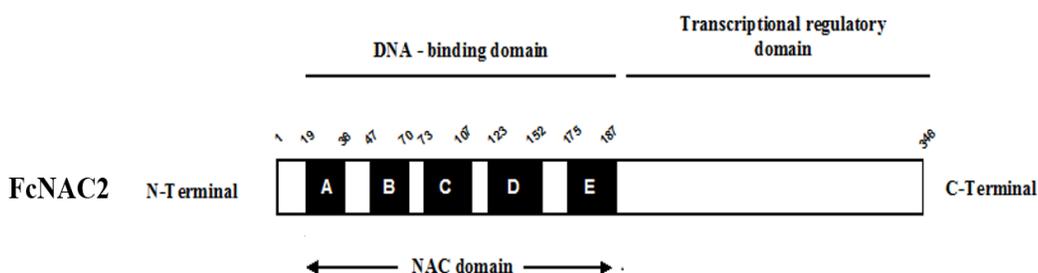


Figura 20. Representación esquemática del FT FcNAC2, donde se muestra el dominio de unión a DNA, dividido en 5 subdominios (A a E), el dominio NAC y el dominio de regulación transcripcional.

Considerando las secuencias amino ácidas de FcNAC2, FcNAC1 y miembros de la familia NAC que se encuentran depositadas en bases de datos públicas, se propuso llevar a cabo un análisis de alineamientos múltiples, con el objetivo de poder evidenciar en mayor detalle la composición de los dominios presentes en estas secuencias. Este análisis permitió evidenciar el alto grado de conservación que presenta el dominio NAC, donde el extremo C-terminal de todos los miembros utilizados mostraron un alto grado de divergencia (Fig. 21) lo cual se encuentra detalladamente descrito en la literatura (Xie y cols., 2000). Referente a la clasificación, en función de la estructura primaria que presenta esta familia

de factores de transcripción, según Purinak y cols., (2012) es posible ubicar a FcNAC2 en el grupo I, los que son caracterizados por poseer el dominio NAC altamente conservado en el N-terminal, subdividido en 5 subdominios conservados y una zona C-terminal. FcNAC2 no presenta una extensión de la zona N-terminal anterior al dominio NAC, el cual si está presente en FcNAC1.

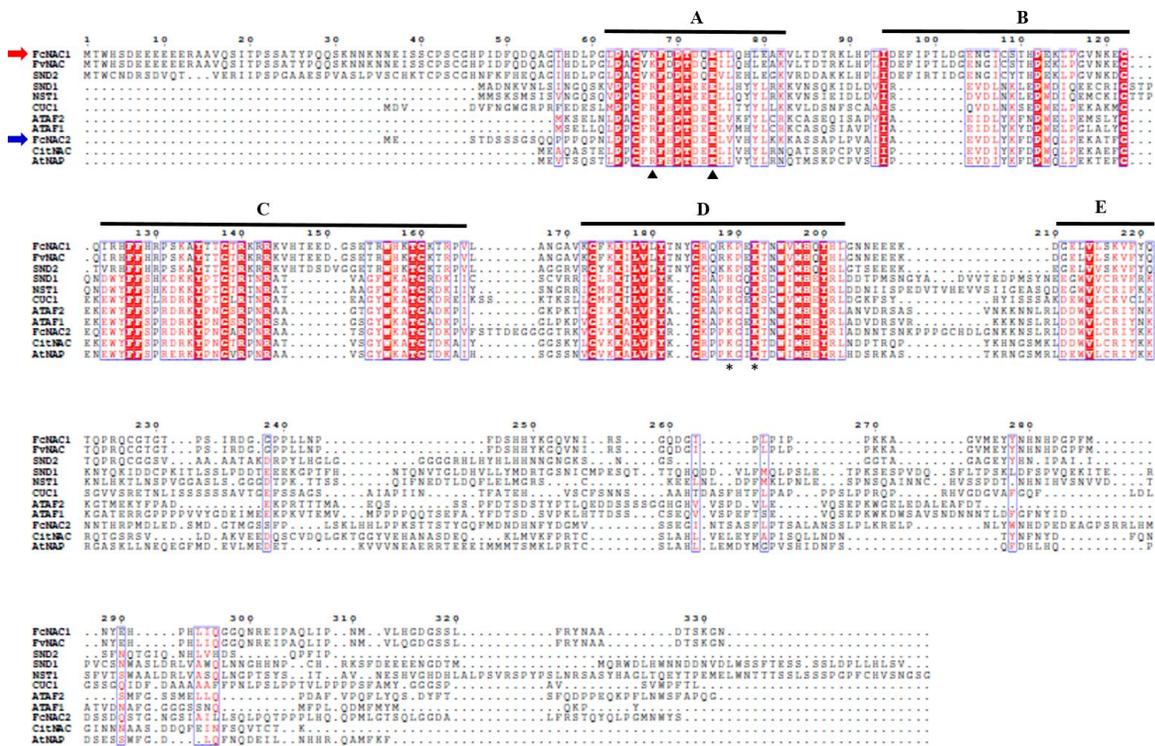


Figura 21. Alineamiento múltiple de la secuencia amino acídica deducida de FcNAC2 y diferentes miembros de la familia NAC. El alineamiento fue realizado con el programa ESPrift (<http://esprift.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>). FcNAC1 se encuentra marcado con una flecha roja y FcNAC2 con flecha azul. Las cajas representan los 5 subdominios presentes en el dominio NAC. (Números de accesiones: FcNAC1 (AKC96459), FvNAC (XP_004293895), NST1 (NM_130243), SND1 (EF101892), CUC1 (EU550396.1), ATAF1 (NM_100054.3), ATAF2 (NM_147856.4), CitNAC (EF185419.1), AtNAP (NM_105616.4), SND2 (NC_003075.7) y FcNAC2).

3.2. Análisis filogenético.

Los genes NAC han sido descritos de ser específicos del reino vegetal, reportándose más de cien genes en la especie modelo *Arabidopsis* (Riechmann y cols., 2000). Solo una proporción del total de proteínas NACs han sido estudiadas a la fecha y, a su vez, la familia completa ha sido vinculada con diversos procesos de formación y desarrollo de las plantas, entre ellos programas de desarrollo (Souer y cols., 1996), defensa (Xie y cols., 1999) y respuesta ante estrés abiótico (Collinge y cols., 2001). Considerando la diversidad de funciones que podrían estar desempeñando estas proteínas en las plantas y con la mirada en poder generar algún tipo de información relacionada a ¿cuál podría ser la potencial función que podría estar realizando FcNAC2 en *F. chiloensis*? Se realizó un análisis filogenético considerando 22 secuencias con funciones descritas en la literatura que son parte de la familia NAC. Para ello, se consideró representantes de diversos organismos como: tomate, cebada, arroz, citrus, petunia, leguminosa, entre otros. El resultado de este ensayo se puede observar en la figura 22, en la que FcNAC2 agrupa con miembros relacionados a senescencia, cercano a AtNAC2 y NAM-B1. Se describe en la literatura que el factor de transcripción AtNAC2 presenta modulación de sus niveles de expresión por la acción de fitohormonas como ABA y ANA, donde plantas que sobre-expresan AtNAC2 expuestas a condiciones de estrés salino muestran un incremento en el número de raíces laterales, lo cual lleva a pensar que AtNAC2 podría ser un gen que puede incorporar estímulos medioambientales al proceso de desarrollo de las plantas (He y cols., 2005). Adicionalmente, se describe que NAM-B1 es un factor de transcripción de la familia NAC y se vincula con roles en la regulación de la senescencia y remobilización de proteínas (Jamar y cols., 2010). Tomando en consideración la información anteriormente mencionada y el análisis filogenético, se podría hipotetizar que el factor de transcripción FcNAC2 estaría relacionado con funciones similares en *F. chiloensis*, contribuyendo así, en el proceso de senescencia frutal durante el desarrollo y maduración del fruto de *F. chiloensis*.

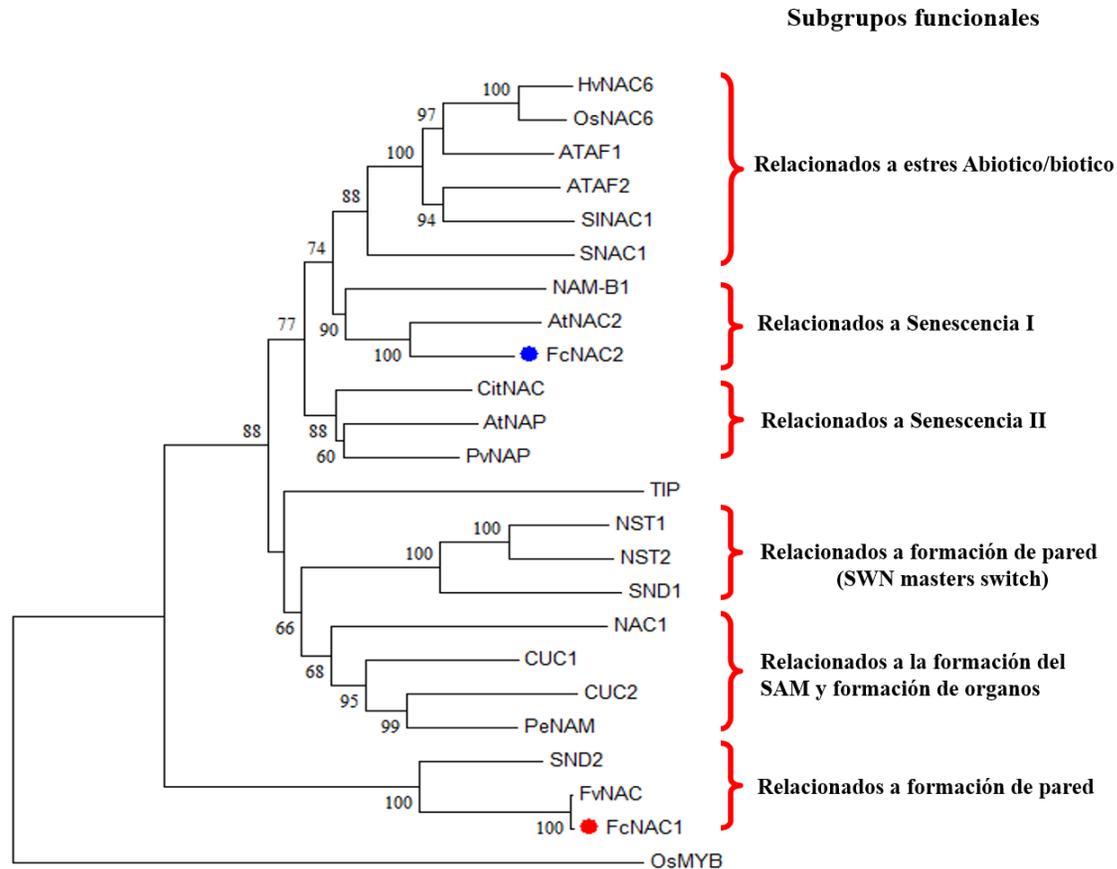


Figura 22. Análisis filogenético de FcNAC2 con miembros de la familia NAC con función conocida. Como se aprecia en la imagen, FcNAC2 agrupa con miembros de la familia NAC relacionados a senescencia, cercano a AtNAC2. Para este análisis fueron utilizadas las siguientes secuencias amino acídicas: (Números de accesoión: HvNAC6 (AM500854.1), OsNAC6 (AB028185.1), ATAF1 (NM_100054.3), ATAF2 (NM_147856.4), SINAC1 (NM_001247553.3), SNAC1 (KM265360.1), AtNAC2 (AB049071.1), NAM-B1 (KF541318), CitNAC (EF185419.1), AtNAP (AJ222713), PvNAP (XP_007158644), SND1 (EF101892.1), NST1 (NP_182200), NST2 (NP_191750), NAC1 (NP_175997), CUC1 (NP_188135), CUC2 (AB002560), PeNAM (X92205), TIP (NP_197847), SND2 (NP_194579), FvNAC (XP_004293895) y FcNAC1 (AKC96459)). El factor de transcripción OsMYB (CAA72218) fue utilizado como control (rama externa) y el árbol filogenético fue realizado con el programa MEGA5, haciendo uso del algoritmo neighbor joining, con 1000 réplicas.

3.3. Análisis de expresión del gen *FcNAC1* en frutos y tejidos vegetativos.

Cuando se analizan los datos provenientes de las librerías de RNA-seq realizadas a partir del material biológico de frutos de *F. chiloensis*, fue posible identificar que *FcNAC2* presentó patrones de expresión diferenciales, por esta razón, se procedió a realizar la evaluación de la expresión relativa del gen *FcNAC2*, a través de PCR en tiempo real (qPCR). Para esto, se realizó extracciones de RNA de tejidos frutales considerando los estadios de maduración mencionados en los capítulos anteriores (C1, C2, C3 y C4) y también de tejidos vegetativos: flores, hojas, raíces, tallos y estolones.

Luego de obtenidos y analizados los datos generados por el análisis de qPCR, se pudo observar que *FcNAC2* mostró patrones de expresión diferenciales en los distintos estadios que dan cuenta del proceso de desarrollo y maduración de los frutos de *F. chiloensis*, como así también, en los distintos tejidos vegetativos utilizados. El perfil de expresión de *FcNAC2* arrojó que sus niveles de transcritos no presentan diferencia estadísticamente significativa en los estadios C1 y C2, los cuales corresponden a estadios tempranos e inmaduros de desarrollo y maduración frutal. Sin embargo, un notorio cambio en el perfil transcripcional ocurre en la transición entre los estadios C2 y C3, manteniendo este incremento hacia el estadio C4 (Fig. 23 A). Por otro lado, tejidos vegetativos fueron evaluados para identificar la específica expresión de *FcNAC2*. Los análisis de expresión génica arrojaron que los niveles de transcritos del gen *FcNAC2* fueron altos en raíces, tallos, y estolones no encontrándose lo mismo para hojas y flores (Fig. 23 B).

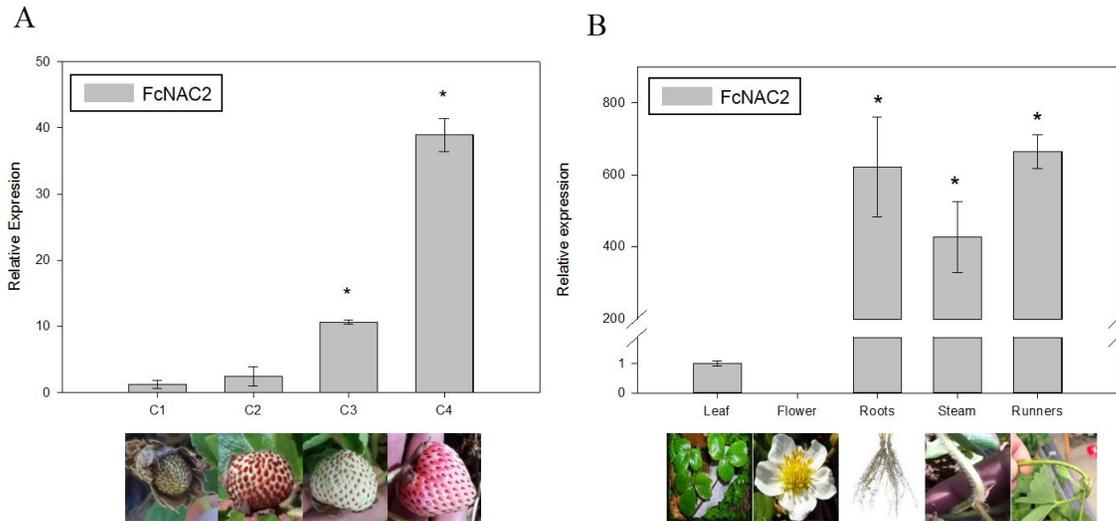


Figura 23. Análisis de expresión relativa del gen *FcNAC2* en diferentes tejidos. A) qRT-PCR durante el desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis* (C1, C2, C3 y C4). B) qRT-PCR de diferentes tejidos de la planta (hojas, flores, raíces, tallos y estolones). Todas las extracciones de RNA fueron realizadas usando el método CTAB (Chang et al. 1993). El gen *FcGAPDH* fue utilizado como gen calibrador. Asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) comparado contra C1, en el caso de los frutos y hoja en el caso de los tejidos vegetativos.

Los mecanismos moleculares que dan cuenta del proceso de maduración y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis* son, a la fecha, no del todo claro y se requieren más análisis para poder comprender en mayor medida estos importantes procesos biológicos. Se describe en la literatura que enzimas y proteínas que cumplen roles fundamentales durante el proceso de maduración y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*, presentan alzas, tanto en sus perfiles transcripcionales como también en las actividades de sus enzimas (Figueroa y cols., 2008; Opazo y cols., 2010). Lo anterior es concomitante con lo encontrado en nuestros análisis de expresión relativa en frutos, donde *FcNAC2* muestra alzas en su acumulación de transcritos a medida que el fruto se desarrolla y alcanza la maduración (Fig. 23, A). Esto permitiría pensar que podría existir algún grado de regulación por parte de este factor de transcripción y la expresión de genes relacionados a la remodelación de pared celular durante el desarrollo, maduración y ablandamiento de los frutos. Por otro lado, fue posible determinar que *FcNAC2* presenta altos niveles de acumulación de transcritos en estolones, tallos y raíces (Fig. 23, B), lo cual hace sentido,

debido a que se describe en la especie modelo *Arabidopsis* que el gen *AtNAC2* presenta niveles de expresión diferenciales en tallos y raíces, donde además su expresión es modulada por señales hormonales como ABA, ANA y también ACC. Ese ha propuesto así, como un gen sensor de variados tipos de estrés, como aumento de salinidad. Plantas que sobre expresan *AtNAC2* presentan un mayor número de raíces laterales al ser expuestas a condiciones de estrés por salinidad (He y cols., 2005). Esta información indicaría que el gen *FcNAC2*, podría estar actuando como un regulador de señales medioambientales tanto en el fruto, como en la planta, no descartando que pudiera interactuar con otros miembros de esta vasta familia génica.

3.4. Análisis funcional *in-planta* del gen *FcNAC2* por transactivación transcripcional y su potencial interacción con *FcNAC1*.

En miras de poder generar mayor conocimiento e información que dé cuenta de la potencial función que podría estar desempeñando *FcNAC2* durante eventos relacionados a maduración y ablandamiento de los frutos de frutilla chilena blanca, se propuso llevar a cabo ensayos funcionales *in planta*, haciendo uso de la técnica de transactivación transcripcional mediada por luciferasa dual en hojas jóvenes de *N. benthamiana*. Así, se pudo evaluar la actividad transcripcional del factor de transcripción *FcNAC2* en el reconocimiento de elementos *cis* presentes en secuencias promotoras de genes relacionados a la remodelación de la pared celular. También, se estudió la potencial interacción con el factor de transcripción *FcNAC1*, promoviendo la expresión del gen reportero (LUC). Todo esto, con la finalidad de poder comprender si existe algún grado de interacción entre estos dos genes encontrados diferencialmente expresados durante el desarrollo y maduración de frutos de *F. chiloensis*.

En el reino de las plantas, la familia NAC constituye un prominente grupo de factores de transcripción (Kim y cols., 2009). Donde se ha descrito que los genomas de *A. thaliana*, tabaco y arroz contienen más de 100 genes que codifican para miembros de factores de transcripción de la familia NAC, convirtiéndolos en una de las familias más numerosas de reino vegetal (Ooka y cols., 2003). Además, ha sido reportado que estos

factores de transcripción, presentan la particularidad de poder reconocer e interactuar con elementos de respuesta en *cis* presentes en las regiones promotoras de genes, conocidos como NACBS como lo describe Aida y cols., (1997). Considerando ésta información, se procedió a realizar un análisis *in-silico* de secuencias pertenecientes a promotores de genes relacionados a la remodelación de pared celular provenientes de *F. chiloensis*, *PL* (*Pectate liase*) y *EXP2* (*Expansine 2*) los cuales han sido reportados por Concha y cols., 2013, donde evidenciamos la presencia de elementos en *cis* del tipo NACBS, específicamente del tipo SNBEs, mediante el uso de la herramienta PlantPan 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/promoter.php>).

Luego del análisis de secuencia realizado, se diseñó constructos para realizar ensayos funcionales de transactivación transcripcional mediante luciferasa dual, donde se generó los constructos *35S::FcNAC2* y *35S::FcNAC1*. Estos fueron insertos en el vector pHEX y las secuencias promotoras de los genes relacionados a la remodelación de pared celular fueron clonados en el vector pGREEN-0800LUC. Además, al igual que en el capítulo I, se utilizó la secuencia promotora del gen *FvDFR*, la cual fue transactivada por los factores de transcripción *FvMYB10* y *FvBHLH*, utilizados como controles positivos de la técnica. Los resultados de la relación REN/LUC no arrojaron diferencias estadísticamente significativas para las plantas que fueron transformadas con la combinación *35S::FcNAC2* y *proFcPL::LUC*, en relación a su respectivo control. Por otra lado, una actividad transcripcional estadísticamente significativa fue evidenciada para las plantas que fueron agroinfiltradas con la combinación *35S::FcNAC2* y *proFcEXP2::LUC* (Fig. 25). Cuando centramos la atención en la potencial interacción que podrían presentar *FcNAC2* y *FcNAC1*, los resultados muestran lo siguiente: la relación REN/LUC de las plantas transformadas con la combinación *35S::FcNAC1* más *35S::FcNAC2* y la secuencia promotora *proFcEXP2::LUC*, evidenció diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas control, a su vez, la relación REN/LUC de las plantas transformadas con la combinación *35S::FcNAC1* más *35S::FcNAC2* y la secuencia promotora *proFcPL::LUC*, también arrojaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas control, mostrando en ambos casos aumentos de la actividad transcripcional del gen *LUC* (Fig. 24). Finalmente, el control negativo utilizado en este experimento, la secuencia promotora del

gen *FvDFR* (*proFvDFR*), no fue transactivado por el producto del gen *FcNAC2* ni por la combinación *FcNAC1-FcNAC2*, pero si fue transactivado por la combinación de los factores de transcripción *FvMYB10* y *FvBHLH*. Además, se realizó la transactivación de la secuencia promotora del gen *Poligalacturonasa* de *Malus domestica*, donde fue posible evidenciar que tanto los constructos *35S:FcNAC1* y *35S:FcNAC2*, por si solos, no muestran diferencias estadísticamente significativas en la relación REN/LUC respecto a las plantas control, sin embargo, la combinación *35S:FcNAC1* más *35S:FcNAC2* demuestran diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas control (Fig. 25).

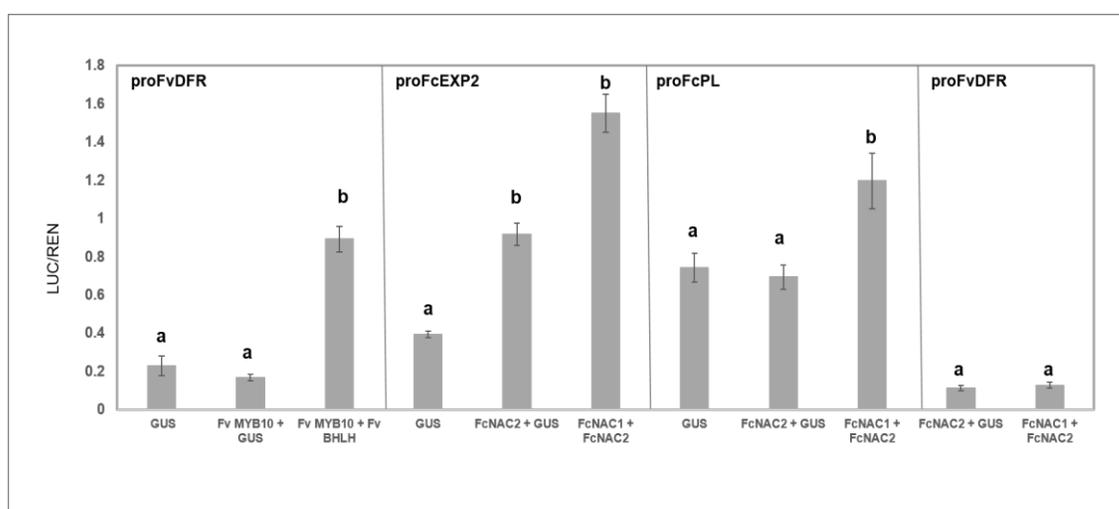


Figura 24. Ensayo funcional del gen *FcNAC2* mediante transformación transiente de hojas de Tabaco y su potencial interacción con *FcNAC1*. Razón LUC/REN obtenida a través de ensayo luciferasa dual entre la interacción del gen *FcNAC2* con secuencias promotoras de los genes *proFvDFR* (*Dihydroflavonol reductase* (no publicada);1560 pb), *proFcEXP2* (*Expansine 2* (número de accesoión de GenBank KC527027); 847 pb) y *proFcPL* (*Pectate lyase* (número de accesoión GenBank KC527025); 1038 pb) en hojas de *N. benthamiana* transformadas mediante *agrobacterium thumefaciens*. *GUS* representa el plasmidio 35S-Pro-GUS (control negativo). *FvMYB10* (número de accesoión GenBank EU155163.1) y *FvBHLH* (*Basic hélix loop hélix* (no publicada);1932 pb) fueron usados como controles positivos de la técnica. Las barras representan la medición de luminiscencia de 4 réplicas y las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) comparados con sus respectivos controles *GUS*.

El experimento de luciferasa dual, permitió evidenciar por primera vez la transactivación de secuencias promotoras de genes relacionados a la remodelación de la pared celular de *F. chiloensis* mediante factores de transcripción NACs (*FcNAC2*) y la

combinación de estos (*FcNAC1* y *FcNAC2*). Es ampliamente descrito en la literatura, que los factores de transcripción de la familia NAC presentan la particularidad de poder generar tanto homo como heterodímeros, lo que conlleva a que puedan interactuar con una amplia gama de integrantes de ésta familia génica. Se ha descrito mediante deleciones del dominio NAC, que el factor de transcripción *AtNAC1* es capaz de dimerizar y que más de una región de este dominio participa en esta asociación (Xie y cols., 2000). Otro claro ejemplo, se encuentra en la especie modelo *Prunus persica* donde los genes *BLOOD* (*BL*) y *PpNAC1*, los cuales son miembros de la familia NAC, pueden activar la ruta biosintética de las antocianinas, modulando la expresión de genes claves de esta ruta metabólica, mediante la formación de heterodímeros, demostrándose con ensayos funcionales en plantas de tabaco (Zhou et al. 2015). Se ha descrito también, que *SINAC4*, mediante la formación de homodímeros, podría interactuar con las proteínas *NOR* y *RIN*, afectando de cierta forma la maduración frutal y la acumulación de carotenoides (Zhu y cols., 2014). Caso similar es encontrado en estudios realizados en banana, donde se muestra que los niveles de expresión de varios factores de transcripción NAC son inducidos durante la maduración frutal y que algunos de ellos pueden interactuar mediante dimerización con factores de transcripción del tipo EIL (Shan y cols., 2012). Finalmente, se ha demostrado la participación de FT NAC en la maduración frutal de *A. Arguta*, donde se evidencia que éstos promueven la producción de terpenos en este fruto, tomando así relevancia durante el proceso de maduración frutal (Nieuwenhuizen et al., 2015).

Los resultados indican que *FcNAC2* regula de forma positiva la secuencia promotora del gen *FcEXP2*, pero no se evidencia el mismo comportamiento con las secuencias promotoras de *FcPL* y *FvDFR* (Fig. 25). A su vez, se pudo determinar que la combinación de estos dos factores de transcripción fueron capaces de transactivar las secuencias promotoras *FcEXP2*, *FcPL* (Fig. 24) y *MdPG* (Fig. 25). Estos resultados permiten hipotetizar un posible rol por parte del gen *FcNAC2* y *FcNAC1* en la regulación transcripcional de genes relacionados al metabolismo de las pectinas y a la ruptura de puentes de hidrógeno entre fibras de celulosas y hemicelulosas mediados por expansinas y, en este sentido, estar contribuyendo con el proceso de remodelación de la pared celular durante el desarrollo y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*. Finalmente, estos datos

permiten inferir que podría existir una cooperación e interacción de estos dos factores de transcripción modulando la expresión de genes durante el proceso de desarrollo y maduración de los frutos de frutilla chilena blanca.

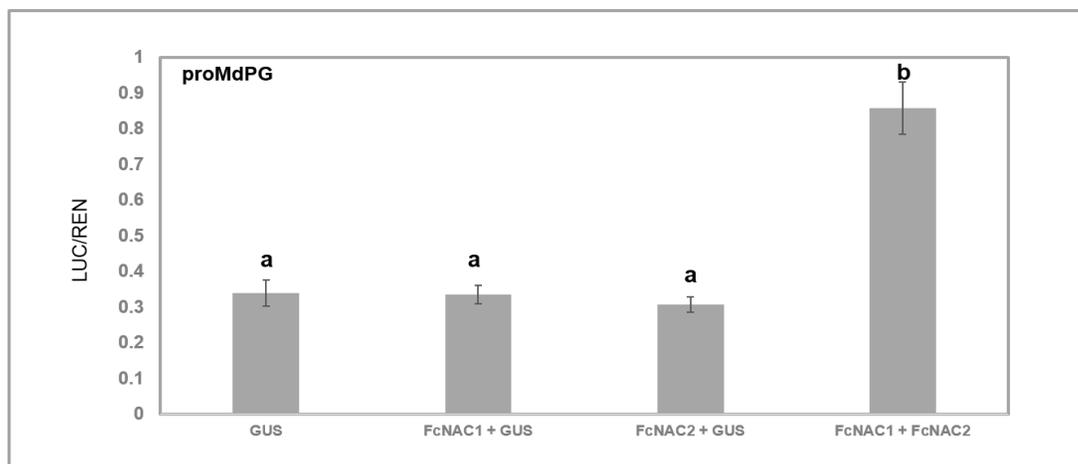


Figura 25. Ensayo funcional del gen *FcNAC2* mediante transformación transiente de hojas de Tabaco y su interacción con *FcNAC1* en la transactivación del promotor del gen *Poligalacturonasa* de *Malus domestica*. Razón LUC/REN obtenida a través de ensayo luciferasa dual entre la interacción del gen *FcNAC2* con secuencias promotoras de los genes *proFvDFR* (*Dihydroflavonol reductase* (no publicada);1560 pb), *proFcEXP2* (*Expansine 2* (número de accesoión de GenBank KC527027); 847 pb) y *proFcPL* (*Pectate lyase* (número de accesoión GenBank KC527025); 1038 pb) en hojas de *N. benthamiana* transformadas mediante *agrobacterium thumefaciens*. *GUS* representa el plasmidio 35SPro-GUS (control negativo). *FvMYB10* (número de accesoión GenBank EU155163.1) y *FvBHLH* (*Basic hélix loop hélix* (no publicada);1932 pb) fueron usados como controles positivos de la técnica. Las barras representan la medición de luminiscencia de 4 réplicas y las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) comparados con sus respectivos controles *GUS*.

4. CONCLUSIONES

En el capítulo descrito anteriormente, fue posible caracterizar un cDNA con alta homología a miembros de la familia de factores de transcripción NAC, el cual fue denominado FcNAC2. Esta secuencia presenta en su extremo N-terminal el dominio característico de la familia NAC, subdividido en sus 5 sub dominios del A-E. A través de análisis filogenéticos fue posible evidenciar que FcNAC2 agrupa con secuencias pertenecientes a miembros de la familia NAC relacionados a senescencia presentes en *A. Thaliana* (*AtNAC1*). El perfil transcripcional de *FcNAC2* durante el desarrollo y maduración de los frutos de frutilla chilena fue diferencial entre los distintos estadios, mostrando mayores acumulaciones en estadios maduros, sugiriendo un potencial rol en éstos periodos de desarrollo frutal. Además, se pudo evidenciar que éste gen presenta expresiones diferenciales en tallos, estolones y raíces, lo que llevaría a hipotetizar una posible función como captador de señales medioambientales en estos tejidos. Tras la realización de los ensayos funcionales en plantas de tabaco, fue posible determinar que FcNAC2 es capaz de reconocer y transactivar parte de la secuencia promotora del gen *Expansina2* (*FcEXP2*) como homodímero, no obstante, la combinación de los factores de transcripción FcNAC1 y FcNAC2, promueven en mayor medida la actividad transcripcional del promotor del gen *Expansina2* (*FcEXP2*). Por otro lado, FcNAC2 no es capaz de transactivar la secuencia promotora del gen *Pectato liasa* (*FcPL*) por sí solo, pero al ser combinado con FcNAC1, se evidencia una clara activación de la actividad transcripcional, demostrando que el heterodímero si es funcional en el reconocimiento de esta secuencia de DNA. Además, cuando se utilizó la secuencia promotora del gen *Poligalacturonasa* de *Malus domestica* (*MdPG*), tanto FcNAC1 como FcNAC2 por si solos no fueron capaces de transactivar esta secuencia promotora, pero en conjunto fue posible apreciar la transactivación de esta secuencia de DNA. Toda esta información nos permite plantear que tanto *FcNAC2* como *FcNAC1*, podrían ser activos participantes durante el proceso de desarrollo y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis* permitiendo la regulación transcripcional de genes relacionados a la remodelación de la pared celular.

CONCLUSIONES GENERALES

El fruto de *F. chilensis* es una especie que, dadas sus particulares atributos organolépticos y su marcada tolerancia a diversos tipos de estrés, perfila un notorio potencial de transformarse en oferta atractiva a la fruticultura de nuestro país. No obstante, se barajan una amplia gama de aspectos susceptibles de potenciar de forma genética en esta especie, los cuales deben ser abordados en forma previa a fin de poder posicionar un resultado exitoso en el mercado tanto nacional como internacional (Retamales y cols., 2005).

Referente a esta índole, se han propuesto la implementación de variadas líneas de investigación, con miras de poder generar conocimiento relacionado a los fenómenos moleculares que toman preponderancia en la determinación de las variadas características de la frutilla nativa chilena, entre las cuales podemos mencionar: tolerancia a estrés bióticos y abióticos, aroma, textura (ablandamiento) y pigmentación (González y cols., 2009a; González y cols., 2009b; Figueroa y cols., 2008; Saud y cols., 2009).

Indudablemente, uno de los aspectos que debiera ser resultado para *F. chilensis* es la rápida pérdida de la firmeza de sus frutos, lo que genera un acortamiento en su periodo de post-cosecha. Ello se traduce, en un dramático problema al momento de pensar en potenciales estrategias de comercialización de estos apetecidos y llamativos berries. Por esta razón y dado que el proceso de remodelación de la pared celular durante el desarrollo y maduración de los frutos está regulado principalmente a nivel transcripcional, es que se hace necesario acumular un mayor grado de conocimiento concerniente a la regulación de la expresión génica de las vías involucradas en el proceso de ensamblaje y desensamblaje de la pared celular con miras de poder comprender de mejor forma este drástico proceso relacionado a la abrupta caída en la firmeza de estos frutos.

En esta tesis doctoral, se realizó la caracterización del gen *FcNAC1* involucrado en la regulación transcripcional de genes relacionados a la remodelación de la pared celular, durante la maduración y ablandamiento de la frutilla nativa chilena. Con la finalidad de

generar conocimiento sobre esta familia de factores de transcripción, se caracterizó un cDNA que da cuenta de FcNAC1, analizándose su secuencia, análisis filogenéticos, se evidenció su localización sub-celular, se describió su perfil transcripcional en los distintos estadios de maduración de la frutilla chilena blanca como en los distintos tejidos vegetativos. Se realizaron ensayos funcionales y la predicción de su estructura tridimensional. Además, se describió y estudió su secuencia promotora, la presencia de elementos en *cis* de respuestas hormonales y elementos de respuesta a miembros de la familia NAC. Adicionalmente, se estudió su modulación transcripcional mediado por fitohormonas reguladoras del proceso de maduración de los frutos de *F. chiloensis*. Finalmente, se describió otro miembro de esta amplia familia génica, FcNAC2, del cual describimos su secuencia tanto nucleotídica como amino acídica, se realizó análisis filogenéticos, evaluación de sus perfiles transcripcionales tanto en los distintos estadios de maduración de *F. chiloensis*, como en los distintos tejidos vegetativos y se describió mediante ensayos funcionales su potencial interacción con FcNAC1.

En la primera etapa de este estudio doctoral se caracterizó una secuencia cDNA que presenta homología con miembros pertenecientes a la familia de factores de transcripción NAC, la cual a posteriori fue denominada como *FcNAC1*. Esta proteína presentó en su extremo N-terminal el dominio NAC, el cual es altamente conservado en esta familia génica, que se encuentra a su vez subdividido en 5 sub dominios de la A a E. Fue posible determinar que FcNAC1 presenta una extensión de la zona N-terminal, previo al dominio NAC, lo que permitió clasificar a FcNAC1 como miembro del grupo V. Cuando se realizó análisis filogenéticos, fue posible evidenciar que FcNAC1 clasifica cercano a SND2, el cual es un gen clave en la ruta de regulación de la expresión de genes relacionados a la remodelación de pared celular en *A. thaliana* y cuando se analizó los perfiles transcripcionales de *FcNAC1* durante el desarrollo y maduración de los frutos de *F. chiloensis*, se pudo evidenciar que la tasa de transcritos aumenta concomitante con el desarrollo y maduración de los frutos. Esto lleva a sugerir un potencial rol en el proceso de desarrollo y maduración de estos mismos. A su vez, cuando se analizó el perfil transcripcional en tejidos vegetativos, fue posible evidenciar que el gen *FcNAC1* presenta acumulaciones diferenciales en flor, tejido el cual es paso previo a la formación de los

frutos. Se realizó una predicción de localización celular del factor de transcripción FcNAC1, siendo posible determinar que presenta señal de localización nuclear, lo cual fue corroborado mediante ensayos de transformación transitoria en hojas de tabaco. Esto permitió evidenciar que esta proteína se encuentra alojada en el núcleo, cumpliendo sus funciones como activador de la transcripción. Cuando se realizó ensayos funcionales de transactivación transcripcional en plantas de tabaco, se pudo determinar que el factor de transcripción FcNAC1 es un activador de la transcripción, donde este tuvo la capacidad de reconocer y transactivar el promotor del gen *Pectato liasa (FcPL)*, mediante la formación de homodímeros, los cuales permiten el reconocimiento de surcos mayores del DNA. Con esta información, se planteó la idea de que *FcNAC1*, estaría envuelto en la regulación transcripcional de genes relacionados al proceso de remodelación de la pared celular durante el ablandamiento de los frutos de frutilla chilena blanca. Probablemente estaría relacionado al metabolismo de las fibras de pectinas que componen parte importante de la matriz de la pared celular. Tras el análisis de la estructura atómica que da cuenta del factor de transcripción FcNAC1, fue posible determinar que el dominio NAC a nivel tridimensional es altamente conservado, que es de vital importancia la formación de puentes salinos, en nuestro caso entre residuos LYS y GLU de ambas cadenas para el proceso de dimerización y que este dominio de interacción con el DNA se encuentra favorablemente conformado por residuos con carga positiva.

Una segunda etapa en esta tesis doctoral contempló la obtención y el estudio de la secuencia promotora del gen *FcNAC1* y poder comprender aspectos relacionados a la modulación de la expresión del gen FcNAC1 mediado por fitohormonas de vital relevancia durante el proceso de desarrollo y maduración de los frutos de *F. chiloensis*. Fue posible obtener una secuencia río arriba del codón ATG del gen FcNAC1 de 1488 pb que, tras análisis bioinformáticos, evidenció la presencia de elementos regulatorios en *cis* de respuesta a señales hormonales, entre ellos ácido abscísico, auxinas, giberilinas, metil jasmonato y ácido salicílico. Esto orientó sobre una posible regulación hormonal de nuestro gen de interés, mediada por señales hormonales presentes en el fruto. A su vez, se evidenció llamativamente la presencia de variados elementos en *cis* de respuesta a miembros de la familia NAC, encontrando específicamente elementos en *cis* del tipo

SNBEs, las cuales son secuencias palindrómicas de 19 pb aprox, infiriendo una potencial regulación transcripcional de *FcNAC1* por miembros de esta familia, o en su defecto, por sí mismo. Finalmente, en este apartado, se determinó que la modulación transcripcional del gen *FcNAC1* es orquestada por vías de señalizaciones hormonales, luego de realizar los ensayos con fitohormonas, pudiendo evidenciar que ácido abscísico estaría actuando con un efecto regulatorio positivo en la actividad transcripcional de *FcNAC1* y, por otro lado, auxinas estarían actuando con un efecto regulatorio negativo, pues presentan un efecto regulatorio negativo en la actividad transcripcional de *FcNAC1*. Esta modulación de la expresión génica encontrada para el gen *FcNAC1*, podría ser explicada por la presencia de elementos regulatorios en *cis* presentes en la secuencia promotora de *FcNAC1*, lo que nos permite generar mayor información sobre la expresión diferencial que presenta este gen, a través del proceso de maduración y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis*.

La última etapa de este estudio pudo establecer y caracterizar otra secuencia de cDNA con alta similaridad a integrantes de la súper familia de factores de transcripción NAC, el cual fue clasificado como FcNAC2. Esta secuencia al igual que FcNAC1, contiene en su extremo N-terminal el característico dominio NAC altamente conservado, el cual se encuentra a su vez subdividido en 5 subdominios del A-E. FcNAC2 a diferencia de FcNAC1 no presenta una extensión previa a la formación del dominio NAC, lo que indica que este factor de transcripción pertenece al grupo I. Cuando se realizó los análisis filogenéticos, fue posible determinar que FcNAC2 agrupa filogenéticamente con secuencias de la familia NAC, los cuales han sido relacionados a senescencia en *A. Thaliana* (*AtNAC1*) y cuando se realizó los análisis transcripcionales de *FcNAC2* durante el proceso de desarrollo y maduración de los frutos de *F. chiloensis*, fue posible determinar que existe una expresión diferencial entre los distintos estadios ensayados, mostrando mayores acumulaciones de RNAs mensajeros en etapas culmines del desarrollo y maduración frutal. Lo anterior, sugiere un potencial rol en estos periodos, relacionados a la senescencia frutal. Además, fue posible determinar que éste gen presenta expresiones diferenciales en tallos, estolones y raíces, con lo cual permite hipotetizar sobre una posible función como captador de señales medioambientales por parte de estos tejidos. Posterior a la realización de los ensayos funcionales de luminometría por luciferasa dual, se determinó que FcNAC2

presenta la capacidad de interactuar y reconocer al promotor del gen *Expansina2* (*FcEXP2*) como homodimero, sin embargo, cuando se realizó la combinación FcNAC1 más FcNAC2, se evidenció una mayor actividad transcripcional del promotor del gen *Expansina2* (*FcEXP2*). Cuando se realizó los ensayos funcionales utilizando la secuencia promotora del gen *Pectato liasa* (*FcPL*) y FcNAC2, no se evidenció actividad transcripcional, pero cuando se hizo la combinación FcNAC2 más FcNAC1, se evidencia una clara activación de la actividad transcripcional, demostrando que el heterodimero si es funcional en el reconocimiento de esta secuencia de DNA. Con miras de poder indagar en mayor profundidad sobre la función que estarían realizando estos dos factores de transcripción, tanto actuando solos o como compañeros, se realizó ensayos funcionales utilizando la secuencia promotora del gen *Poligalacturonasa* de *Malus domestica* (*MdPG*), donde se determinó que cuando son empleados los factores de transcripción por si solos, no son capaces de transactivar esta secuencia promotora, pero cuando son empleados en conjunto, pueden transactivar esta secuencia promotora, cumpliendo su función como heterodímeros.

Finalmente, todos los resultados obtenidos y recopilados a través de la realización de esta tesis doctoral aportan una gran cantidad de conocimiento e información respecto de los perfiles transcripcionales de genes relacionados coordinación de la expresión génica de actores envueltos en la remodelación de la pared celular a lo largo del desarrollo de frutos de frutilla chilena blanca, incrementando la información sobre el proceso de desarrollo, maduración y ablandamiento de este llamativo berrie.

Toda esta información permite plantear que tanto *FcNAC1* como *FcNAC2*, podrían ser activos participantes durante el proceso de desarrollo, maduración y ablandamiento de los frutos de *F. chiloensis* permitiendo la regulación transcripcional de genes relacionados a la remodelación de la pared celular. Finalmente, cabe mencionar que el poder estudiar FTs permite abrir potentes líneas de investigación, debido a que con la información que se puede obtener es posible generar conocimiento valioso sobre genes blanco, y concomitante a esto, desarrollar estudios que apunten a caracterizar genes para futuros programas de mejoramiento genético no solo en *F. chiloensis*, sino que también en otras especies.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., Tasaka, M. 1997. "Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant". *Plant Cell*. 9: 841-857.

Alexander, L., & Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of experimental botany*, 53(377), 2039-2055.

Bringhurst, R. S. 1990. "Cytogenetics and evolution in American ragaria". *HortScience*. 25: 879-881.

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

Brummell, D. A. and Harpster, M. H. 2001. "Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants". *Plant Mol Biol*. 47: 311-340.

Carpita, N. C. and 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". *Plant J*. 3: 1-30.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J., 1993. "A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees". *Plant Mol. Biol. Rep*. 11: 113-116.

Chow, C. N., Zheng, H. Q., Wu, N. Y., Chien, C. H., Huang, H. D., Lee, T. Y., ... & Chang, W. C. (2016). PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1154-D1160.

Collinge, M., & Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant molecular biology*, *46*(5), 521-529.

Collinge, M., & Boller, T. 2001. "Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding". *Plant molecular biology*, *46*: 521-529.

Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 433-444.

Ernst, H. A., Nina Olsen, A., Skriver, K., Larsen, S., & Lo Leggio, L. 2004. "Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors". *EMBO reports*, *5*: 297-303.

Ernst, H. A., Nina Olsen, A., Skriver, K., Larsen, S., & Lo Leggio, L. (2004). "Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors". *EMBO reports*, *5*(3), 297-303.

Espley, R. V., Brendolise, C., Chagné, D., Kuttly-Amma, S., Green, S., Volz, R., 2009. "Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples". *The Plant Cell*. *21*: 168-183.

Figueroa, C. R., Pimentel, P., Gaete-Eastman, C., Moya, M., Herrera, R., Caligari, P. D. S., et al., 2008. "Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes". *Post. Biol. and Tech.* *49*: 210-220.

Figuroa, C. R., Rosli, H. G., Civello, P. M., Martinez, G. A., Herrera, R., Moya-León, M. A. 2010. "Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria x ananassa* fruits". *Sci. horticulturae*. 124: 454-462.

Figuroa, C.R., Pimentel, P., Dotto, M.C., Civello, P.M., Martínez, G.A., Herrera, R., Moya-León, M.A. 2009. "Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit. Effect of auxin treatment.". *Postharvest Biol. Technol.* 53: 51-57.

Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K. and Ohme-Takagi, M., (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signal pathway, *Plant J.* 39: 863-876.

Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual review of plant biology*, 52(1), 725-749.

Greve, K., Tanja, L. A., Jensen, M. K., Poulsen, F. M., & Skriver, K. (2003). Interactions between plant RING-H2 and plant-specific NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization. *Biochemical Journal*, 371(1), 97-108.

Hancock, J.F., Lavín, A., Retamales, J.B. 1999. "Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile". *Hortscience*. 34: 814-816.

Hao, Y. J., Wei, W., Song, Q. X., Chen, H. W., Zhang, Y. Q., Wang, F., ... & Ma, B. (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal*, 68(2), 302-313.

He, X. J., Mu, R. L., Cao, W. H., (2005) AtNAC2 a transcription factor downstream of ethylene and auxin signal pathways is involved in salt stress response and lateral root development, *Plant J.* 44: 903-916.

Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Lydiate, D. 2003. "Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress". *Plant molecular biology*. 53: 383-397.

Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., 2005. "Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants". *Plant Meth.* 1: 13.

Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., & Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 12987-12992.

Hussey, S. G., Mizrachi, E., Spokevicius, A. V., Bossinger, G., Berger, D. K., Myburg, A. A. 2011. "SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in Arabidopsis fibres and increases fibre cell area in Eucalyptus". *BMC plant biology*, 11: 173.

Hussey, S. G., Mizrachi, E., Spokevicius, A. V., Bossinger, G., Berger, D. K. and Myburg, A. A., (2011) *SND2*, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell Wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell área in *Eucalyptus*, *BMC P. Biol.* 11: 173.

Jamar, C., Loffet, F., Frettinger, P., Ramsay, L., Fauconnier, M. L., & Du Jardin, P. (2010). NAM-1 gene polymorphism and grain protein content in Hordeum. *Journal of plant physiology*, 167(6), 497-501.

Jensen, M. K., Kjaersgaard, T., Petersen, K., Skriver, K., (2010) NAC genes; Time-specific regulators of hormonal signaling in Arabidopsis, *Plant Sig. Beh.* 5: 907-910.

Jia, H. F., Chai, Y. M., Li, C. L., Lu, D., Luo, J. J., Qin, L., & Shen, Y. Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, 157(1), 188-199.

John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A., Grierson, D. 1997. "Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs". *Plant molecular biology*. 33: 641-651.

Kang, C., Darwish, O., Geretz, A., Shahan, R., Alkharouf, N., & Liu, Z. (2013). Genome-scale transcriptomic insights into early-stage fruit development in woodland strawberry *Fragaria vesca*. *The Plant Cell Online*, 25(6), 1960-1978.

Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., ... & Nam, H. G. (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science*, 323(5917), 1053-1057.

Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Demura, T. 2005. "Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation". *Genes and development*. 19: 1855-1860.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Thompson, J. D. 2007. "Clustal W and Clustal X version 2.0". *bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. 1993. "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures". *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.

Lavin, A., Del Pozo, A., Maureira, M. 2000. "Distribución de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch.en Chile". *Plant Genet. Resour.* 122: 24-28.

Lin, J. F., and Wu, S. H. 2004. "Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves". *The Plant Journal*, 39: 612-628.

Lu, M., Ying, S., Zhang, D. F., Shi, Y. S., Song, Y. C., Wang, T. Y., & Li, Y. (2012). A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 31(9), 1701-1711.

Luthy, R., Bowie, J., Eisenberg, D. 1992 "Assessment of protein models with three-dimensional profiles", *Nature*. 356: 83-85.

McCarthy, R. L., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2011). Secondary wall NAC binding element (SNBE), a key cis-acting element required for target gene activation by secondary wall NAC master switches. *Plant signaling & behavior*, 6(9), 1282-1285.

Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M. 2007. "NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*". *The Plant Cell*. 19: 270-280.

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M. 2005. "The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence". *The Plant Cell*. 17: 2993-3006.

Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A., Ohtani, M. 2015. "NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants". *Frontiers in plant science*. 6.

Nieuwenhuizen, N. J., Chen, X., Wang, M. Y., Matich, A. J., Perez, R. L., Allan, A. C., Atkinson, R. G. (2015). Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit:

transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and EIN3-like transcription factors. *Plant physiology*, pp-114.

Nishizawai, T., Nagasawai, S., Reatamales, J.B., Lavin, A., Motomura, Y. 2002. "Comparison of cell wall components between *Fragaria x ananassa* and *Fragaria chiloensis* grown in Chile". *J. of Hortic. Science & Biotech.* 77: 404-410.

Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in microbiology*, 4.

Oda, Y., & Fukuda, H. (2012). Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Current opinion in plant biology*, 15(1), 38-44.

Olsen, A. N., Ernst, H. A., Lo Leggio, L., (2005) NAC transcription factors: structurally distinct functionally diverse, *T. Plant Sci.* 10: 79-87.

Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Kikuchi, S. 2003. "Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*". *DNA research*, 10: 239-247.

Opazo, M. C., Figueroa, C. R., Henríquez, J., Herrera, R., Bruno, C., Valenzuela, P. D. T., et al., 2010. "Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hidrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit". *Plant Sci.* 179: 479-488.

Perkins-Veazie, P. M., & Huber, D. J. (1992). Development and evaluation of an in vitro system to study strawberry fruit development. *Journal of experimental botany*, 43(4), 495-501.

Pfaffl, M. W. 2001. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic acids research*. 29: e45-e45.

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., et al. 2005 "Scalable molecular dynamics with NAMD". *J. Comp. Chem.* 26: 1781-1802.

Pimentel, P., Salvatierra, A., Moya-León, M. A., Herrera, R. 2010. "Isolation of genes differentially expressed during development and ripening of *Fragaria chiloensis* fruit by suppression subtractive hybridization". *Journal of plant physiology*, 167: 1179-1187.

Podzimska-Sroka, D., O'Shea, C., Gregersen, P. L., Skriver, K. 2015. "NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops". *Plants*. 4: 412-448.

Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 1-19.

Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., & Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in plant science*, 17(6), 369-381.

Qin, Y., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, L., Zhang, S. 2008. "Transgenic strawberry: state of the art for improved traits". *Biotechnol Adv.* 26: 219-232.

Qinqin, H., Junhong, Z., Hanxia, L., Zhindan, L., Khurram, Z., Bo, O., et al., (2012) Identification and expression pattern one stress-responsive NAC gene from *Solanum lycopersicum*, *Mol. Biol. Rep.* 39: 1713-1720.

Retamales, J.B., Caligari, P.D.S., Carrasco, B., Guillermo, S. 2005. "Current status of the Chilean native strawberry and the research needs to convert the species into a commercial crop". *Hortscience*. 40: 1633-1634.

Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Keddie, J., Adam, L., Yu, G. L. 2000. "Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes". *Science*. 290: 2105-2110.

Rombauts, S., Déhais, P., Van Montagu, M., & Rouzé, P. (1999). PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic acids research*, 27(1), 295-296.

Rose, P. W., Beran, B., Bi, C., Bluhm, W. F., Dimitropoulos, D., Goodsell, D. S., Young, J. 2010. "The RCSB Protein Data Bank: redesigned web site and web services". *Nucleic acids research*, 39:(suppl_1), D392-D401.

Sali, A. 1995. "Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints", *Mol. Med Today*. 6: 270-277.

Shan, W., Kuang, J. F., Chen, L., Xie, H., Peng, H. H., Xiao, Y. Y., Lu, W. J. 2012. "Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening". *Journal of experimental botany*, 63: 5171-5187.

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., et al. 2004. "Toward a systems approach to understanding plant cell walls". *Science*, 306: 2206-2211.

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., Koes, R. 1996. "The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries". *Cell*. 85: 159-170.

Symons, G. M., Chua, Y. J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., Reid, J. B. 2012. "Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry". *Journal of experimental botany*. 63: 4741-4750.

Takada, S., Hibara, K. I., Ishida, T., & Tasaka, M. (2001). The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128(7), 1127-1135.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2004. "Integrative software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment". *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.

Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. "Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter". *The Plant Cell Online*. 16: 2481-2498.

Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9), 2481-2498.

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

Wang, H., Zhao, Q., Chen, F., Wang, M., & Dixon, R. A. (2011). NAC domain function and transcriptional control of a secondary cell wall master switch. *The Plant Journal*, 68(6), 1104-1114.

Welner, D. H., Lindemose, S., Grossmann, J. G., Møllegaard, N. E., Olsen, A. N., Helgstrand, C., ... & Leggio, L. L. (2012). DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *Biochemical Journal*, 444(3), 395-404.

Welner, D. H., Lindemose, S., Grossmann, J. G., Møllegaard, N. E., Olsen, A. N., Helgstrand, C., ... & Leggio, L. L. (2012). DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *Biochemical Journal*, 444(3), 395-404.

Wiederstein, M. and Sippl, M. J. 2007. "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins". *Nucl. Acid. Res.* 35: W407-W410.

Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., & Chua, N. H. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & development*, 14(23), 3024-3036.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., García, J. A., & Gutiérrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant molecular biology*, 39(4), 647-656.

Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant and Cell Physiology*, 33(3), 217-224.

Yang, S. D., Seo, P. J., Yoon, H. K., & Park, C. M. (2011). The Arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *The Plant Cell*, 23(6), 2155-2168.

Yong-Zhong, L., Baig, M. N. R., Rui, F., Jun-Li, Y., Yin-Chuan, C. and Xiu-Xin, D., (2009) Identification and Expression Pattern of a Novel NAM, ATAT, and CUC-Like Gene from *Citrus sinensis* Osbeck, *Plant Mol. Biol. Rep* 27: 292-297.

Zhong, R. and Zheng-Hua, Y., (2014) Complexity of the transcriptional network controlling secondary Wall biosynthesis, *Plant Sci.* 229: 193-207.

Zhong, R., Demura, T., Ye, Z. H. 2006. "SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis". *The Plant Cell.* 18: 3158-3170.

Zhong, R., Lee, C., & Ye, Z. H. (2010). Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 3(6), 1087-1103.

Zhou, H., Lin-Wang, K., Wang, H., Gu, Ch., Dare, A. P., Esplay, R. V., et al., (2015) Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors, *The plant journal*. 82: 105-121.

Zhu, M., Chen, G., Zhou, S., Tu, Y., Wang, Y., Dong, T., Hu, Z. 2014. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. *Plant and Cell Physiology*, 55: 119-135.

Zhu, M., Hu, Z., Zhou, S., Wang, L., Dong, T., Pan, Y., et al., (2014) Molecular characterization of Six Tissue-Specific or Stress-Inducible Genes of NAC Transcription Factor Family in Tomato (*Solanum lycopersicum*), *J. Plant G. Reg.* 33: 730-744.

Zhu, Q., Zou, J., Zhu, M., Liu, Z., Feng, P., Fan, G., ... & Liao, H. (2014). In silico analysis on structure and DNA binding mode of AtNAC1, a NAC transcription factor from Arabidopsis thaliana. *Journal of molecular modeling*, 20(3), 2117.

Zhu, T., Nevo, E., Sun, D., & Peng, J. (2012). Phylogenetic analyses unravel the evolutionary history of NAC proteins in plants. *Evolution*, 66(6), 1833-1848.

ANEXO

Material suplementario

Characterization of *FcNAC1*: A novel transcription factor from
Fragaria chiloensis fruit.

1. Figuras suplementarias.

FcNAC1

Predicted NLSs in query sequence	
MTWHSDEEEEEERAAVQSITPSSATYPQSQKNNKNEISSPCSGHPIDF	50
QDQAGIHDLPGLPAGVKFDPTDQEILQHLEAKVLTDRKHLPLIDEFIPT	100
LDGENGICSTHPEKLPGVNKEGQIRHFFHRPSKAYTTGTRKRRKVHTEED	150
GSETRWHKTKTRPVLANGAVKGFKKILVLYTNYGRQRKPEKTNWVMHQY	200
HLGNNEEKDGLVLSKVFYQTQPRQCGTGTPSIRDGGPPLLNPFDSHHY	250
KGQVNIRSGQDGIPLPIPPKAGVMEYNNHHPGPFMNYEHPHLIQGGQN	300
REIPAQLIPNMLHGDGSSLFRYNAADTSKGN	332

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
138	GTRKRRKVHTE	9.5
138	GTRKRRKVHT	10

Figura suplementaria 1. Predicción de la señal de localización nuclear del factor de transcripción *FcNAC1* realiaada con el progama NLSmapper. En color rojo se aprecia la señal de localización nuclear.

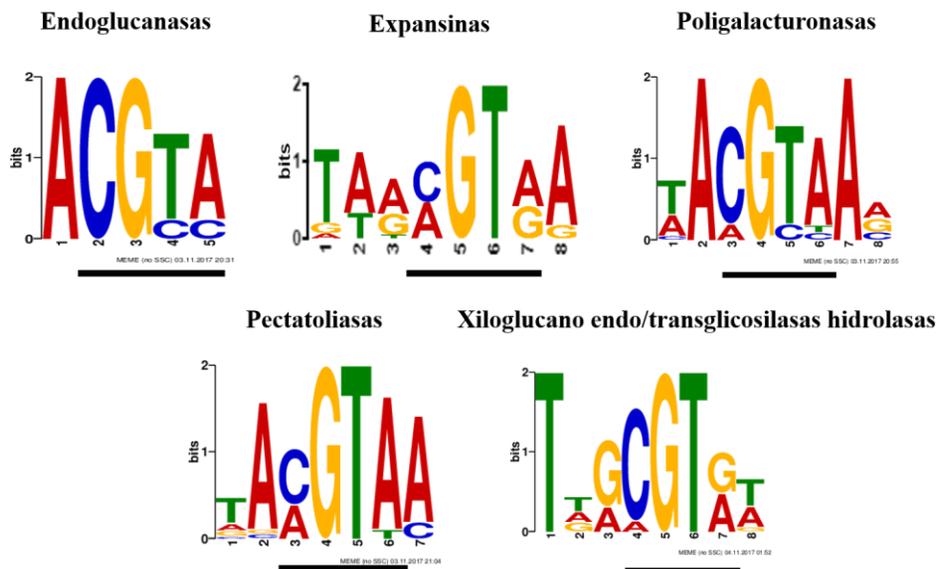


Figura suplementaria 2. Logos encontrados en promotores de genes relacionados a la remodelación de pared celular de genes diferencialmente expresados en *F. vesca*.

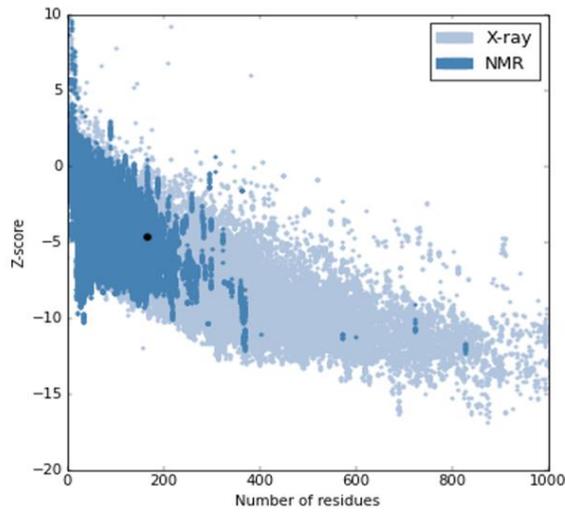


Figura suplementaria 3. Análisis del programa ProSa donde es posible apreciar que nuestro factor de transcripción clasifica con datos cristalográficos obtenidos por resonancia magnética nuclear.

FcNAC2

Predicted NLSs in query sequence	
MESTDSSSGSQPPPPQPNLPPGFRFHTDEELVVHYLKKKASSAPLPVAI	50
IAEVDLYKFDPWQLPEKATFGEQEWYFFSPDRKYPNGARP NRAATSGYW	100
KATGTDKPVFSTTDEGGGTRKVGKKALVYRGKPPKGIKTNWIMHEYR	150
IADNNTSNKPPPGCHDLGNKNSLRDDWVLCRIYKKNNTHRPMDLEDSM	200
DGTMGSSFPLSKLHHLPPKSTTSTYGFMDNDHNFYDGMVSSEGINTSAS	250
FLPTSALANSSLPLKRELPNLYWNHDPED EAGPSRRLHMDSSDQSTGNGS	300
IAILLSQLPQT PPLHQ PMLGTSQLGGDALFRSTQYQLPGMNNYS	346

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
263	PLKRELPNLYWNHDPED EAGPSRRLHMD	6.5

Figura suplementaria 4. Predicción de la señal de localización nuclear del factor de transcripción *FcNAC2* realiaada con el progama NLSmapper. En color rojo se aprecia la señal de localización nuclear.

3. Abreviaturas

ANOVA: análisis de varianza

bHLH: hélice rizo hélice básica (basic helix loop helix)

bp: pares de bases (base pairs)

C1: estadio de desarrollo 1

C2: estadio de desarrollo 2

C3: estadio de desarrollo 3

C4: estadio de desarrollo 4

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CHI: chalcona isomera

Ct: ciclo umbral (threshold cycle)

CTAB: bromuro de cetiltrimetilammonio

Da: Dalton

dCTP: desoxi citosina trifosfato

DEPC: dietilpirocarbonato

DFR: dihidroflavonol reductasa

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAsa I: ácido desoxirribonucleasa I

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F: flor

FT: factor de transcripción

g: gramo

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GC: guanina-citosina

GSP: partidor gen-específico (gene specific primer)

GUS: β -glucoronidasa

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

IAA: ácido indol 3-acético

IPTG: isopropil-beta-tiogalactopiranosido

L: hoja

LB: Luria-Bertani

LSD: mínima diferencia significativa (least significant difference)

MADS: sigla de MCM1, AG, DEFA y SRF (los primeros cuatro miembros identificados de este tipo de factores de transcripción)

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico

MeOH: metanol

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MMA: MS-MES-sacarosa

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MS: Murashige-Skoog

MYB: (gen relacionado a) mieloblastosis

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

Na₂SO₄: sulfato de sodio

NCBI: Centro Nacional de Bioinformática (National Center of Bioinformatics)

nm: nanómetro

OD: densidad óptica (optical density)

OH: grupo hidroxilo

Oligo(dT)₂₀: oligo (desoxitimina)₂₀

PCR: reacción de polimerasa en cadena

p/v: peso/volumen

PVP: polivil pirrolidona

qRT-PCR: reacción de transcripción reversa y polimerasa en cadena cuantitativa (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)

R: estolón

RACE: Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (Rapid Amplification of cDNA Extremes)

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: ácido ribonucleico de interferencia

RNAsa: ácido ribonucleasa

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: reacción de transcripción reversa y polimerasa en cadena (reverse transcription-polymerase chain reaction)

S: sur (south)

seg: segundo

SL: solución líquida

SSC: NaCl-citrato de sodio

SSCE: NaCl-citrato de sodio-EDTA

STE: NaCl-Tris-EDTA

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

U: unidad

UTR: region no traducida (untranslated region)

UV: ultravioleta

V: volts

v/v: volumen/volumen

WRKY: triptófano-arginina-lisina-tirosina

xg: gravedad

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-indol- β -D-galactósido

YM: (extracto) levadura-malta

μ m: micrómetro

μ g: microgramo

μ M: micromolar

μ l: microlitro

$^{\circ}$ C: grados Celsius