



CAMBIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASOCIADOS A MODIFICACIONES DE LA PARED CELULAR DURANTE EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DE FRUTOS DE FRAGARIA CHILOENSIS

**CARLOS RODRIGO FIGUEROA LAMAS
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La frutilla chilena (*Fragaria chiloensis*) posee características de calidad de fruto únicas, que la convierten en un producto atractivo para la diversificación de la producción de berries en Chile. El fruto presenta un color blanco, así como un aroma y sabor característico. Sin embargo, la firmeza del fruto, carácter que afecta la calidad vida de postcosecha de los frutos, y por ende, de importancia para un programa de mejoramiento genético de *Fragaria*, ha sido poco estudiado en *F. chiloensis*. La idea que el ablandamiento asociado a la maduración de frutos carnosos es una consecuencia directa de la degradación enzimática de la pared celular, ha sido ampliamente estudiada. El objetivo de la presente Tesis es analizar y comparar los cambios en la composición de polímeros de pared celular a medida que transcurren cambios en la firmeza del fruto durante el crecimiento y maduración de la frutilla chilena y frutilla comercial (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). Del mismo modo, se compara los niveles de expresión génica y actividad enzimática durante el proceso de ablandamiento en ambas especies. Frutos de ambas especies cultivados en el mismo huerto comercial (Contulmo, Región del Biobío, Chile), se clasificaron según tamaño y características morfológicas, y luego se les midió la firmeza. Posteriormente, de cada estadio de desarrollo se extrajo pared celular, y se obtuvo fracciones enriquecidas en pectinas, hemicelulosas y celulosa. Las distintas fracciones se cuantificaron y se determinó el grado de despolimerización de pectinas y hemicelulosas. Por otra parte, en cada especie se estudió el patrón de expresión (mediante Northernblot) y los niveles de actividad enzimática de poligalacturonasa (PG), pectato liasa (PL), pectina metilesterasa (PME), β galactosidasa (β Gal), α arabinofuranosidasa (AFasa), β xilosidasa (β Xyl), xilanasa, endoglucanasa (EGasa) y

expansina (Exp). Finalmente, esta información se relacionó con los cambios en la pared celular y la evolución de la firmeza del fruto. Los frutos de ambas especies de frutilla fueron clasificadas durante el crecimiento y la maduración en cuatro estadios de acuerdo al tamaño y a la coloración del receptáculo: verde pequeño (VP), verde grande (VG), transición (T) y maduro (M). La clasificación en *F. chiloensis* incorporó la coloración de los achenios. En ambas especies se observó una rápida disminución de la firmeza, aunque se observó una mayor reducción en firmeza entre los estadios VG y T en *F. chiloensis* comparado con *F. × ananassa*. Entre los mismos estadios, se observó una mayor disminución en el contenido de pectinas unidas covalentemente en *F. chiloensis*. Además, la actividad PG fue más alta en *F. chiloensis* en los estadios VG, T y M, lo que produciría una solubilización acelerada de pectinas en *F. chiloensis*. El nivel de expresión de mRNAs de PL es mayor en *F. × ananassa* al final de la maduración, lo que produciría una mayor despolimerización de pectinas covalentes en esta especie. El estudio de los niveles de azúcares neutros (AN) durante el desarrollo del fruto reveló un nivel elevado en la fracción péctica soluble en agua en el estadio T de *F. chiloensis*. Este fenómeno podría tener su origen en la solubilización de pectinas altamente ramificadas. Por otra parte, se observó una leve despolimerización de hemicelulosas en *F. chiloensis* durante la maduración junto a una elevada expresión de genes como EGasa y expansinas, y a una alta actividad enzimática de EGasa y xilanasas. Los resultados obtenidos permitieron establecer que en *F. chiloensis*, la rápida solubilización de pectinas no ramificadas (homogalacturonano) y ramificadas (ramnogalacturonanoI) tendría una mayor importancia en el ablandamiento acelerado de fruto que la despolimerización del homogalacturonano. En tanto, la gran despolimerización de pectinas observada en *F. × ananassa*, pareciera tener lugar al final de la maduración. Existen cuatro genes, relacionados al metabolismo de pared celular de ambas especies, cuya expresión se asocia directamente al ablandamiento del fruto: PG, PL, EGasa y Exp. PG y EGasa se expresan tempranamente en *F. chiloensis*, favoreciendo la solubilización de pectinas y despolimerización de hemicelulosas, respectivamente. Por otra parte, PL se expresa en un mayor nivel en *F. × ananassa* colaborando junto a PG en la despolimerización de pectinas covalentes. La alta actividad de PG observada en *F. chiloensis* durante el estadio VG, indicaría un efecto en la solubilización acelerada de pectinas. La actividad β Gal y AFasa, en aumento hacia el final de la maduración, podría estar relacionada a la desglicosilación de las cadenas laterales de las pectinas

solubilizadas en *F. chiloensis* y desde las pectinas covalentes e iónicas en *F. × ananassa*. A su vez, la actividad EGasa, xilanasas y β Xyl en aumento concomitante a la maduración, tendría efecto en la despolimerización de hemicelulosas en *F. chiloensis*. En definitiva, tanto el metabolismo como la arquitectura de pared celular de los frutos de especies de *Fragaria* son diferentes durante el crecimiento y maduración de éstos. Los genes analizados en esta investigación pueden ser empleados como marcadores para asistir los programas de mejoramiento genéticos de frutilla.

ABSTRACT

The Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) is noted for its good fruit quality characters, being an attractive product for diversification of Chilean berry production. The fruit has a typical white color, aroma and flavor. However, fruit firmness that affects postharvest life and therefore an important character to consider in a *Fragaria* breeding programmes, has received little attention in *F. chiloensis*. Researchers have supported the idea that the ripening-associated softening of fleshy fruit is a direct consequence of enzyme-mediated cell wall degradation. The purpose of this thesis is to analyze and compare the changes in cell wall polymers composition during growth and ripening of the Chilean and commercial strawberries (*F. × ananassa* cv. Chandler). Also to compare the level of gene expression and enzymatic activity during softening of both species. Fruit from both species cultivated in the same commercial field (Contulmo, Biobío Region, Chile) were classified according to weight and morphological characters, and then, fruit firmness was recorded. Subsequently, fruit cell wall material was extracted from each developmental stage, obtaining pectins, hemicelluloses and cellulose-enriched fractions. The different fractions were quantified and the depolymerization degree of pectins and hemicelluloses was determined. On the other hand, the gene expression pattern (by means of Northern blot) and enzymatic activity levels of polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL), pectin methyl esterase (PME), β galactosidase (β Gal), α arabinofuranosidase (AFase), β xylosidase (β Xyl), xylanase, endoglucanase (EGase) and expansin (Exp) were analyzed in each species. Finally, the information was related with cell wall changes and fruit firmness evolution. Fruit from both strawberry species were classified during growth and ripening into four stages according to size and receptacle color: small green (SG), large green (LG), turning (T) and ripe (R). Developmental stage classification of *F. chiloensis* incorporates the achene color. A relatively fast decrease in firmness was observed in both species, although a greater reduction in firmness between LG and T stages was observed in *F. chiloensis* compared to *F. × ananassa*. A greater reduction in covalent pectin content was noted in *F. chiloensis* than in *F. × ananassa* between the same stages. Moreover, PG activity was higher in *F. chiloensis* than in *F. × ananassa* at LG, T and R stages, which could be the reason of the rapid pectin solubilization in *F. chiloensis*. The mRNA level of PL is greater in *F. × ananassa* than in *F. chiloensis* at the end of

ripening, which could induce the great depolymerization of covalent pectin in *F. × ananassa*. The analysis of neutral sugars (NS) content during fruit development revealed a high level of NS in the watersoluble pectic fraction in *F. chiloensis* at the T stage. This phenomenon could be due to the solubilization of highly branched pectins. On the other hand, a low hemicellulose depolymerization was observed with a concomitant high level expression of EGase and expanins genes and a high enzymatic activity of EGase and xylanase during ripening of *F. chiloensis*. The results allowed us to establish that in *F. chiloensis* the rapid solubilization of linear (homogalacturonan) and highly branched pectins (rhamnogalacturonan) should be of greater relevance in its rapid fruit softening than homogalacturonan depolymerization. On the other hand, the great pectin depolymerization observed in *F. × ananassa* seems to take place at the end of ripening. There are four genes, involved in cell wall metabolism of both species, whose expression is directly related to fruit softening: PG, PL, EGase and Exp. PG and EGase are expressed early in *F. chiloensis* helping the solubilization of pectin and hemicellulose depolymerization, respectively. On the other hand, PL is expressed at a greater level in *F. × ananassa* than in *F. chiloensis* collaborating with PG in the depolymerization of covalent pectin. The high level of PG observed in *F. chiloensis* during the LG stage could have a role in the rapid solubilization of pectin. The β Gal and AFase activities that increased to the end of ripening in both species may be related deglycosylation from solubilized side chains of pectin in *F. chiloensis*, and from covalent and ionic pectins in *F. × ananassa*. At the same time, the EGase, xylanase and β Xyl activities, increasing in parallel with ripening, could be related to hemicellulose depolymerization in *F. chiloensis*. In conclusion, the cell wall metabolism and architecture of both *Fragaria* species differ during fruit growth and ripening. The target genes analyzed in this research could be used as markers to help strawberry breeding programmes.