

**CARACTERIZACIÓN DE XILOGLUCANO
ENDOSTRANGLICOSILASA/HIDROLASA (XTH)
EN FRUTILLA CHILENA (*FRAGARIA CHILOENSIS* L. (MILL.) Y
FRUTILLA SILVESTRE (*FRAGARIA VESCA*).**

**M^a. CECILIA OPAZO DELGADO
DOCTORADO EN CIENCIAS, MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La frutilla comercial (*Fragaria x ananassa*) es consumida por millones de personas alrededor del mundo, y es conocida por su delicado sabor y alto contenido de vitaminas. Chile es uno de los mayores productores de frutilla junto con Perú y Argentina. La mitad de la producción es consumida localmente en fresco y casi todo el resto se procesa, y sólo una pequeña parte se exporta. *Fragaria x ananassa* es un octoploide y es un híbrido entre *Fragaria virginiana* Duch. y *Fragaria chiloensis* (L.) Mill. La frutilla chilena blanca (*Fragaria chiloensis* L. (Mill)) es una especie nativa de Chile, además de su sabor y aroma, es reconocida por características como gran tamaño y color característico de fruto. Ha emergido como un nuevo berry de exportación. Sin embargo, presenta problemas que necesitan ser resueltos como por ejemplo el bajo rendimiento, temporada productiva de corta duración y el rápido ritmo de ablandamiento de fruto. *Fragaria vesca* o frutilla silvestre ha surgido como un modelo muy atractivo para el estudio de la maduración en frutos no climatéricos debido a que presenta un genoma pequeño, es diploide, se dispone de metodología de transformación y posee un ciclo reproductivo corto. La concreción de la secuenciación del genoma de *Fragaria vesca* ssp. *vesca* accesión Hawaii 4 abre una herramienta de análisis y de referencia. El ablandamiento de fruto es producto de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en los estadios finales del desarrollo que involucran la modificación de la pared celular producto de la acción conjunta de enzimas asociadas a esta estructura. La pared celular es una estructura dinámica que se compone de polisacáridos como xiloglucanos y no polisacáridos como ligninas y proteínas. La enzima xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH) es una de las enzimas asociada a pared celular y su acción afectaría la composición de las cadenas de xiloglucanos que entrecruzan las microfibrillas de celulosa. El objetivo principal de esta tesis es caracterizar la(s) XTH presentes en *F. chiloensis* y *F.*

vesca y determinar la variación en la expresión de éstas durante el desarrollo del fruto. Por otro lado, es de interés el estudio de la variación en la expresión de las XTH de *F. chiloensis* por efecto acción de hormonas vegetales.

En *F. chiloensis* fueron identificados los genes *FcXTH1* y *FcXTH2*. Ambos genes pertenecen a familias filogenéticas distantes y presentan una organización genómica diferente. Se analizó el perfil transcripcional de ambos genes. Los transcritos de *FcXTH1* incrementaron durante el ablandamiento de los frutos, en tanto que los de *FcXTH2* parecen estar relacionados con procesos vegetativos. Ensayos de actividad y de inmunodetección permitieron detectar proteína XTH y elevada actividad xiloglucano endotransglucosilasa (XET) y actividad endohidrolítica (XTH) en el estadio T (turning). El tratamiento de frutos con hormonas reveló que la expresión de los genes de XTH es modulada por algunas hormonas. Con el objetivo de explicar este comportamiento, se obtuvieron las secuencias promotoras de los genes *FcXTH1* and *FcXTH2*. El análisis *in silico* reveló la existencia de putativos elementos *cis* que han sido descritos como elementos regulatorios de respuesta a hormonas como auxinas (ANA), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA3) y etileno. La fruta fue tratada con dichos reguladores de crecimiento con el fin de esclarecer su efecto en la expresión de las isoformas de *FcXTH*. Se observó un efecto activador de parte de ANA y GA3, y un efecto inhibitorio de etileno sobre la expresión de *FcXTH1* y *FcXTH2*, y un efecto activador de ABA sobre la expresión de *FcXTH1*, lo que es consistente con la presencia de elementos regulatorios encontrados en las secuencias promotoras de los genes *FcXTH1* y *FcXTH2*. Las XTHs pertenecen a una familia multigénica. Con el fin de identificar los genes de XTH en *Fragaria vesca* se utilizó la información disponible en <http://www.strawberrygenome.org>. La búsqueda permitió la identificación de 26 genes codificantes para *FvXTHs*. El nombre de cada gen fue proporcionado de acuerdo a la nomenclatura utilizada para la familia de XTH en *A. thaliana*. Se analizó el número de intrones y exones de cada gen y se construyó un árbol filogenético con las diferentes XTHs identificadas. Los resultados obtenidos permitieron la clasificación de los genes de XTH de *F. vesca*. Con el fin de identificar elementos estructurales característicos de las XTHs se realizó un análisis comparativo contrastando con XTHs resueltas experimentalmente y con la ayuda de herramientas bioinformáticas. El análisis

demostró la existencia de elementos estructurales compartidos como el sitio activo, de secuencia DEIDFEFLG, la cuál es altamente conservada. También el patrón característico de hojas α -plegadas y de α -hélices en el extremo N-terminal está presente. Finalmente se realizó el análisis de expresión de los genes en diversos estadios de frutos y tejido vegetativo de *F. vesca*. El análisis de expresión relativa muestra que los genes *FvXTH* presentan patrones de expresión diversos de acuerdo a estadios de maduración de fruto o tejido vegetativo analizado y que éstos no se relacionan con el grupo filogenético al que pertenece. La realización de análisis funcionales permitirá ahondar en la caracterización de la función de estos genes y aclarar su participación en el proceso de maduración y ablandamiento de fruto.

ABSTRACT

The commercial strawberry (*Fragaria x ananassa*) is consumed by millions of people around the world and it is known for its delicate flavor and high vitamin content. Chile is one of the largest producers of strawberries along with Peru and Argentina. Half of the production is consumed locally in fresh and most of the rest is processed and only a small part is exported. *Fragaria x ananassa* is an octoploid and is a hybrid between *Fragaria virginiana* Duch. and *Fragaria chiloensis* (L.) Mill.

The white Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* L. (Mill)) is native from Chile, and in addition to its flavor and aroma, it is known for its large fruit size and characteristic color. It has been emerged as a new export berry. However, it has problems that need to be solved, such as low yield, short growing season and a fast softening rate. The wild strawberry, *Fragaria vesca*, has risen as a very attractive model for the study of ripening in non-climacteric fruit due to its small size genome, because it is diploid and because the availability of a transformation method and a short reproductive cycle. The sequencing of the genome of *Fragaria vesca* ssp. *vesca* accession Hawaii 4 offers an analysis and reference tool.

Fruit softening corresponds to physiological and biochemical changes which occur in the last stage action of cell wall associated enzymes. The cell wall is a dynamic structure composed of polysaccharides such as xyloglucans and non-polysaccharides such as lignins and proteins. Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) is one of the enzymes associated with cell wall and its action could affect the composition of xyloglucan chains that intersect the cellulose microfibrils. The aim of this thesis is to characterize the XTHs present in *F. chiloensis* and *F. vesca* and to determine the changes in the expression of these genes during fruit development. Furthermore, it is of interest to study the changes in the expression of *F. chiloensis*'s XTHs promoted by plant hormones.

In *F. chiloensis* two genes were identified, *FcXTH1* and *FcXTH2*. Both genes belong to distant phylogenetic families and have a different genomic organization. The transcriptional profile of both genes was analyzed. *FcXTH1* transcripts increased during fruit softening, while those of *FcXTH2* seem to be related to vegetative processes. Activity

assays and immunodetection allowed the detection of XTH protein and high xyloglucan endotransglycosylase (XET) and endohydrolytic activity (XTH) at the T stage (turning). The treatment of fruit with hormones revealed that these hormones modulate the expression of XTH genes. In order to explain this behavior, the promoter sequences of *FcXTH1* and *FcXTH2* genes were obtained. *In silico* analysis revealed putative cis elements that have been described as regulatory elements responsive to hormones such as auxins (ANA), abscisic acid (ABA), gibberellins (GA3) and ethylene. The fruit was treated with these growth regulators in order to elucidate the effects on the expression of *FcXTH* isoforms. An activator effect for ANA and GA3 treatments, and an inhibitory effect of ethylene was observed on the expression of *FcXTH1* and *FcXTH2* and activation on the expression of *FcXTH1* by ABA, which is consistent with the presence of regulatory elements found in the promoter sequences of *FcXTH1* and *FcXTH2*. XTHs belong to a multigenic family. In order to identify the XTH genes in *Fragaria vesca* the information available in <http://www.strawberrygenome.org> was used. The search allowed the identification of 26 genes coding for *FvXTHs*. The name of each gene was provided according to the nomenclature used for the XTH family in *A. thaliana*. The number of introns and exons of each gene was analyzed and a phylogenetic tree was built with the different XTHs identified. The results allowed the classification of *F. vesca* XTH genes. In order to identify structural elements characteristic of XTHs a comparative analysis was performed contrasting the sequences with experimentally resolved XTHs with the help of bioinformatic tools. The analysis showed the existence of shared structural elements such as the active site, the DEIDFEFLG sequence, which is highly conserved. The characteristic pattern of α -sheets and α -helices at the N-terminal was also present. Finally, the expression analysis of *FvXTH* genes at different fruit developmental stages and in vegetative tissues was performed. The results showed that differential gene expression patterns exist according to the ripening stage or vegetative tissue and there is no relation between the patterns and the corresponding phylogenetic group. Functional analyzes will allow a deeper characterization of these genes and to clarify their involvement in fruit ripening and softening