

JCH-FC
MAG-BMCN
B 796
C. 1



**Identificación y caracterización de genes regulados
durante la maduración del fruto en
Fragaria chiloensis L. (Mill.)**

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular,
Celular y Neurociencias.

Facultad De Ciencias

Por

Milagros Matilde Bracamonte Nole
Marzo, 2016

Director de Tesis:
Dra. Lorena Norambuena Morales

Director de Tesis:
Dr. Michael Handford

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

Milagros Matilde Bracamonte Nole

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de octubre

Director de Tesis:
Dr. Lorena Norambuena Morales



.....

Co-Director de Tesis
Dr. Michael Handford



.....

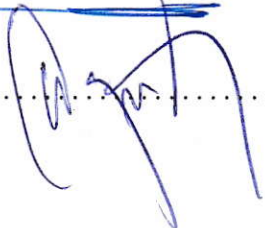
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Liliana Cardemil



.....

Dr. Manuel Paneque



.....

A mis padres, por el apoyo incondicional que me dan, por su amor, por guiarme a lo largo de mi vida, por enseñarme el valor de las cosas y lo importante de la vida.

A mi hermana, por siempre creer en mí, aún cuando yo no lo hacía.

A mi hermano, por hacerme tanto reír y confiar en mí.

A mi abuelita que me cuida desde algún lugar en el cielo desde hace ya 8 años.

A mi sobrino Alejandro por alegrarme todos los días con sus bailes, sus cantos y las ocurrencias que puede tener.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Elio y Violeta, por su apoyo, amor infinito e incondicional y valores inculcados, por esa conexión mágica que existe entre nosotros.

Agradezco a mi hermana Teresa, y Daniel, por hacerme el incepton para venir a Chile, por acogerme y siempre tratar de tener ese calor de hogar.

Agradezco a mi hermano que aunque fue difícil para él que yo me fuera de su lado, siempre estuvo alegre por mí.

Le doy gracias a la profesora Lorena Norambuena, por aceptar a alguien con quien tan solo converso un par de veces por Skype y permitirle que realizara un sueño que tenía desde muy niña, por confiar en mí, y permitir desarrollarme en este mundo de la Ciencia.

Agradezco al profesor Michael Handford por el aporte en las reuniones y en este gran viaje llamado tesis.

Agradezco infinitamente a mis amigos del LAB, especialmente al Team LNM por sus aportes y críticas constructivas/destructivas, entre ellos destacando a Nia, Mirna, Claudio y Carlitos. También a mis amigos del Anillo, Sara, Uri, Analía y Aliosha. Gracias por sus preguntas, críticas y tiempo para escucharme y ayudarme a mejorar.

Agradezco a las personas y grandes amigas que conocí a través del laboratorio como Claudia, Giovy, Yu, gracias por toda la rosadez.

También agradezco a todas las personas del Centro de Biología Molecular Vegetal, por sus aportes y críticas en las presentaciones, y por la buena onda. Resaltando a Angelica Vega, la profe Liliana Cardemil y la profesora Claudia Stange.

Financiamiento

Los estudios del Magister en Ciencias Biológicas fueron realizados gracias a la Beca Presidente de la República de Perú.

El desarrollo de esta tesis fue financiada por el Proyecto Anillo ACT- 11000, que tiene como jefe de proyecto a la Dra. Alejandra Moya. Además contó con el apoyo del proyecto Fondecyt 1120289.

Índice	ii
Listado de Tablas	vi
Listado de Figuras	vii
Abreviaturas utilizadas	x
1. Resumen	xi
2. Abstract	xiii
3. Introducción	1
3.1. Desarrollo de fruto y maduración	1
3.2. Regulación hormonal en frutos no climatéricos	2
3.3. <i>Fragaria chiloensis</i> como modelo de estudio	5
3.4. Posibles genes involucrados en la maduración de <i>Fragaria chiloensis</i> .	7
4. Hipótesis	11
5. Objetivos	11
5.1. Objetivo general	11
5.2. Objetivos específicos	11
6. Material y métodos	12
6.1. Material Biológico	12
6.1.1. Frutos de <i>Fragaria chiloensis</i>	12
6.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	12
6.1.3. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
6.2. Métodos	14
6.2.1. Extracción de ácidos nucleícos	14
6.2.1.1. Extracción de ARN del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	14
6.2.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>Fragaria chiloensis</i>	15
6.2.1.3. Extracción de ADN plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	16
6.2.2. Cultivo y transformación de <i>Escherichia coli</i>	17
6.2.2.1. Condiciones de cultivo <i>Escherichia coli</i>	17
6.2.2.2. Obtención de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente	17
6.2.2.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	18
6.2.3. Cultivo y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18

6.2.3.1. Condiciones de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
6.2.3.2. Obtención de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> quimiocompetentes	20
6.2.3.3. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
6.2.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa y purificación de bandas	21
6.2.5. Electroforesis en gel denaturante de ARN de <i>Fragaria chiloensis</i>	22
6.2.6. Síntesis de ADN complementario desde ARN de <i>Fragaria chiloensis</i>	22
6.2.7. Diseño de partidores para amplificar los genes de interés.	23
6.2.8. Amplificación del marco de lectura abierto mediante PCR.	25
6.2.9. Clonación de genes en estudio en vectores de clonamiento utilizando la tecnología Gateway.	27
6.2.10. Secuenciación de genes en estudio y análisis de resultados.	28
6.2.11. Expresión de FcLANCL2 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
6.2.11.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con pGPDFcLANCL2-EGFP	28
6.2.11.2. Análisis de localización subcelular de la proteína FcLANCL2-EGFP en <i>S. cerevisiae</i>	30
6.2.11.3. Tinción con el marcador vacuolar FM4-64.	31
6.2.11.4. Detección de proteínas mediante Western Blot	31
6.2.11.4.1. Extracción de proteínas totales de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	31
6.2.11.4.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
6.2.11.4.3. Western Blot en membrana de nitrocelulosa	32
6.2.12. Ensayos de unión	34
6.2.12.1. Obtención de esferoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
6.2.12.2. Ensayo de unión de [³ H]-ABA a esferoplastos	36
6.2.13. Tratamientos hormonales en los frutos de <i>Fragaria chiloensis</i> .	37
6.2.14. Evaluación de niveles de transcrito mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) de los genes en estudio	38

7. Resultados	42
7.1. Obtención de ADN y ARN desde los frutos de <i>Fragaria chiloensis</i>	42
7.2. Identificación de genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en <i>Fragaria chiloensis</i> .	43
7.3. Análisis de la presencia y direccionalidad de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en el vector pCR8/TOPO/GW	46
7.4. Análisis bioinformático de los genes en estudio	50
7.5. Niveles de transcrito de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> de la temporada 2014	55
7.6. Niveles de transcrito de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> en dos temporadas de cosecha: 2012 y 2013.	58
7.7. Síntesis de ADN complementario desde ARN de frutos <i>Fragaria chiloensis</i> tratados con ABA y NAA	61
7.8. Efecto de ABA en los niveles de transcrito de <i>FcLANCL2</i> en el estadio C2 del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	64
7.9. Efecto de NAA en los niveles de transcrito de <i>FcLANCL2</i> en el estadio C2 del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> .	66
7.10. Niveles de transcrito de los genes <i>FcNCED</i> y <i>FcARF2</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	68
7.11. Expresión del gen <i>FcLANCL2</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
7.12. Análisis de la acumulación de la proteína Fc-LANCL2-EGFP en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
7.13. Análisis de la expresión de FcLANCL2-EGFP en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
7.14. Obtención de esferoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que acumulan la proteína de fusión FcLANCL2-EGFP.	77
7.15. Ensayo de Unión de FcLANCL2-EGFP a [³ H]-ABA	79
8. Discusión	
8.1. Los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> presentan dominios conservados característicos de las familias génicas a las cuales pertenecen.	83

8.2. Los niveles de transcrito de los genes FcLANCL2, FcARP y FcSAUR varían a lo largo de los estadios de desarrollo del fruto, en distintas temporadas de cosecha.	84
8.3. FcLANCL2 responde a los tratamientos con ABA y auxina.	86
8.4. En <i>S. cerevisiae</i> la expresión de la proteína FcLANCL2-EGFP se observa en un compartimento endosomal.	87
8.5. Las levaduras transformantes presentan la expresión de FcLANCL2-EGFP.	88
8.6. La proteína FcLANCL2 une a ABA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
9. Conclusiones	91
10. Referencias	92

Listado de Tablas

Tabla 1: Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en el desarrollo de la tesis de magister.	13
Tabla 2: Cepas de <i>Saccharmyces cerevisiae</i> usadas en el desarrollo de la tesis de magister.	14
Tabla 3: Composición de la mezcla de aminoácidos usados.	19
Tabla 4: Partidores usados para el desarrollo de esta tesis de magister.	23
Tabla 5: Programas de amplificación para los diferentes genes usado en el desarrollo de esta tesis	25
Tabla 6: Programa de q RT-PCR usado para todos los partidores usados.	37
Tabla 7: Enzimas de restricción empleadas para los distintos plasmidios con el gen de interés en pCR8/GW/TOPO y tamaño de los fragmentos esperados para verificar la direccionalidad del inserto en el vector.	44
Tabla 8: Enzimas de restricción empleadas para analizar los distintos plasmidios con el gen FcLAN-LIKE2 en el vector pAG426-GPD-ccdB-EGFP y tamaño de los fragmentos esperados para verificar la direccionalidad del inserto.	67

Listado de Figuras

Figura 1: Perfil de crecimiento, respiración y producción de etileno durante el desarrollo, maduración y senescencia de frutos climatéricos y no climatéricos	3
Figura 2: Representación esquemática de los niveles hormonales en los diferentes estadios del desarrollo del fruto de <i>Fragaria x ananassa</i>	4
Figura 3: Estados de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> .	7
Figura 4: Construcciones obtenidas para los vectores de expresión de proteínas en levaduras.	28
Figura 5: Obtención de ADN y ARN proveniente de frutos de <i>Fragaria chiloensis</i> .	40
Figura 6: Identificación de la versión genómica y marco de lectura abierto de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> .	41
Figura 7: <i>Escherichia coli</i> transformante con vectores de clonamiento que portan los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en sus versiones ADN genómico y complementario de <i>Fragaria chiloensis</i> .	43
Figura 8: Análisis de la direccionalidad de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en el vector pCR8/GW/TOPO	46
Figura 9: Similitud de las secuencias <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> con otras especies.	50
Figura 10: Representación gráfica del producto génico de <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> .	51
Figura 11. Distribución exón-intrón de los genes <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> .	52
Figura 12: Niveles de expresión de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	54

Figura 13: Comparación de los niveles de transcrito de los genes <i>FcLANCL2</i> , <i>FcARP</i> y <i>FcSAUR</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> colectados en las temporadas 2012 y 2013	57
Figura 14: Obtención de ADN complementario desde ARN de frutos de <i>Fragaria chiloensis</i> en el estadio C2 tratados con ABA y NAA.	60
Figura 15: Efecto de ABA en los niveles de transcrito de <i>FcLANCL2</i> en el estadio C2 del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> .	62
Figura 16: Efecto de la auxina NAA en los niveles de transcrito de <i>FcLANCL2</i> en el estadio C2 del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i>	64
Figura 17: Niveles de expresión de los genes <i>FcNCED</i> y <i>FcARF2</i> en los distintos estadios de desarrollo del fruto de <i>Fragaria chiloensis</i> .	66
Figura 18: Corroboración de las construcciones pAG426-GPD-ccdB-EGFP y pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP mediante digestión enzimática	68
Figura 19: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformante con pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP	69
Figura 20: Expresión de EGFP en pGPD-FcLANCL2-EGFP y pGPD-ccdB-EGFP en <i>S. cerevisiae</i> .	70
Figura 21: Análisis de la distribución subcelular de la proteína Fc-LANCL2 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	72
Figura 22: Representación gráfica de la obtención de esferoplastos desde células intactas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
Figura 23: Esferoplastos desde levaduras con el inserto pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP	74
Figura 24: Unión de FcLANCL2 a [³ H]-ABA en esferoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	76

Figura 25: Unión de FcLANCL2 a [³H]-ABA en esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, con ABA 100mM y 1 μM.

77

Abreviaturas utilizadas

aa	Aminoácidos.
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> . Herramienta de búsqueda de alineamientos locales.
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CDS	<i>Coding sequence</i> . Secuencia codificante.
dNTPs	Nucleótidos trifosfato.
DTM	Dominio TransMembrana.
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodalton
mg, gr.	Miligramos, gramos
min	Minutos
mL, μ L	Mililitros, microlitros.
mM, μ M	Milimolar, micromolar.
nMoles	Nano moles
NAA	Ácido naftalen acético
$^{\circ}$ C	Grados Celsius.
p/v, v/v	Peso/volumen, volumen/volumen
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PM	Marcador de peso molecular
SI	Sin inserción.

1. RESUMEN

Los frutos de acuerdo a las diferencias fisiológicas pueden ser clasificados en climatéricos y no climatéricos. El proceso de maduración en frutos no climatéricos está regulado por hormonas tales como ABA y auxina, las cuales poseen un rol antagónico en la maduración de esta clase de frutos, ya que los niveles de ABA aumentan conforme el fruto madura y los de auxina disminuyen. *Fragaria chiloensis*, es un fruto no climatérico, cultivado en Chile, con aroma intenso, sabor muy agradable y color blanco-rosado. Para facilitar el estudio de este fruto se caracterizó en 4 estadios de desarrollo (C1, C2, C3 y C4) y se han descrito genes que se expresan diferencialmente en estos estadios (Pimente y col., 2010). Con esta información se seleccionaron tres genes con posible respuesta hormonal; un receptor de ABA perteneciente a la familia de los LANCL2 (*FcLANCL2*) y dos genes con respuesta a auxina *FcARP* y *FcSAUR*. Para *FcLANCL2*, se encontró que posee los dominios característicos de la familia LANCL2, y sus niveles de transcrito varían en las distintas temporadas de cosecha, y posee mayores niveles en el estadio C3. *FcARP* posee dominios conservados para la familia de los ARP, presentando sus mayores niveles de transcrito en estadios tempranos de desarrollo C1 y C2. *FcSAUR* presenta un dominio conservado inducible por auxinas, y sus niveles de expresión varían a las distintas temporadas. Los niveles de transcrito de *FcSAUR* varían dependiendo de la temporada de cosecha, poseyendo mayores niveles de transcrito en C4 para la temporada 2013 y 2014 que para la temporada 2012 en C3. Para evaluar si *FcLANCL2* se regula por fitohormonas ABA y auxina se aplicó exógenamente ABA y NAA a los frutos en los distintos estadios de desarrollo. Se pudo evaluar *FcLANCL2* responde a estas hormonas. Corroborándose

ésta respuesta mediante la cuantificación de niveles de transcrito de genes *FcNCED* y *FcARF2* que responden a ABA y auxina respectivamente. Mediante la expresión de este gen en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae* se evaluó la funcionalidad del producto génico de *FcLANCL2* de ser un receptor de ABA. Concluyéndose así que *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* se expresan diferencialmente en los estadios del desarrollo de fruto, que *FcLANCL2* es regulado por ABA y auxina, y que cumple la función biológica de ser un receptor de ABA.

2. ABSTRACT

Fruits are classified according to their ripening process as climacteric and non-climacteric. In non-climacteric fruits the ripening process is under the control of phytohormones such as abscisic acid (ABA) and auxins. The levels of ABA rise, whilst those of auxin fall during this process. *Fragaria chiloensis* is a non-climacteric fruit, cultivated in Chile, with a pleasant, strong taste and flavor and an attractive color. This fruit was classified in four development stages (C1, C2, C3 and C4), and differentially expressed genes have been described in these stages (Pimentel *et al.*, 2010). Of the genes that are differentially expressed during fruit development, three genes were selected; an ABA receptor encoded by *FcLANCL2*, and two auxin-responding genes, *FcARP* and *FcSAUR*. *FcLANCL2* has the characteristic domains of the LANCL2 family, and the expression of this gene changes in the different years of harvest, with highest levels in C3. *FcARP* has an ARP domain, and the highest levels of transcript in C1 and C2. *FcSAUR* has an auxin-induced domain, and the highest levels are in C4 in 2013 and 2014, but in C3 in 2012. To evaluate whether *FcLANCL2* is regulated by phytohormones, fruits were treated exogenously with ABA or auxin. *FcLANCL2* expression is sensitive to both ABA and auxin. Prove it this response with the quantification of the transcript levels of *FcNCED* y *FcARF2*. The functionality of *FcLANCL2* as an ABA receptor was demonstrated heterologously in *Saccharomyces cerevisiae*. Overall the results suggest that the three genes are differentially expressed in the different stages of development of fruit of *F. chiloensis*, that *FcLANCL2* is regulated by ABA and auxin, and that it has the biological function of an ABA receptor.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Desarrollo de fruto y maduración

Los frutos son una fuente rica en vitaminas y minerales, por lo cual resulta beneficioso incluirlos en la dieta diaria. Para que se consuman los frutos en los distintos lugares del planeta deben de ser cosechados desde los campos de cultivos una vez que éstos hayan alcanzado un cierto estado de madurez. El desarrollo de los frutos es un proceso complejo y altamente coordinado. Durante este proceso el fruto pasa a través de numerosos cambios fisiológicos, bioquímicos y estructurales. Para frutos con pulpa estos cambios producen un fruto succulento, un aumento del contenido de azúcares, un aumento del aroma y el ablandamiento de pericarpio (Osorio y col., 2013), es decir un fruto maduro.

En general, los cambios asociados a la maduración incluyen el cambio del color, pérdida del color verde y un incremento en los pigmentos no fotosintéticos; pérdida en la firmeza, mediante la degradación de la pared celular y alteración de la cutícula; aumento del dulzor, mediante la hidrólisis del almidón y disminución de ácidos orgánicos; y el incremento del aroma, a través de la producción de compuestos volátiles (Giovannoni y col., 2007).

Entre los cambios que se generan en las características cualitativas del fruto se encuentran por ejemplo, el metabolismo de la pared celular y cutícula, causando cambios en la textura del fruto. Este proceso envuelve más de 50 genes asociados a

cambios estructurales de la pared celular (Tomato & Consortium, 2012). Este proceso si bien es beneficioso para favorecer el consumo del fruto y la dispersión de la semilla, hace al fruto sensible al ataque por patógenos como hongos.

3.2. Regulación hormonal en frutos no climatéricos

Los frutos son clasificados según las diferencias fisiológicas en climatéricos y no climatéricos, de acuerdo a la actividad respiratoria y asociación a la biosíntesis de etileno durante la maduración del fruto (Giovanoni 2007 y Nath 2014). Caracterizándose así los frutos climatéricos en aumentar sus tasa de respiración y producción de etileno durante la maduración del fruto, mientras los frutos no climatéricos no presentan este aumento (Vijay y col., 2011) (Figura 1). La síntesis de etileno es autocatalítica en frutos climatéricos como el tomate, manzana y banana, y es esencial para la maduración. De hecho se ha observado que tanto el bloqueo de la síntesis y de la percepción de esta hormona, previene la maduración (Lanahan y col., 1994).

En frutos no climatéricos el proceso de desarrollo del fruto y de maduración comienza con una regulación transcripcional mediante diferentes factores de transcripción como son MADS-9, MYB1 y MYBA1. Estos factores de transcripción generan una regulación hormonal, mediante fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), la cual regula positivamente la maduración, y auxinas y giberelinas (GA), las cuales inhiben el proceso de maduración. También se ha observado una producción de etileno en la maduración de frutos no climatéricos, entre los estadios de desarrollo en los cuales el fruto se encuentra verde aún, sin embargo, la presencia de esta hormona, no es indispensable para generar la maduración del fruto (Osorio y col., 2013).

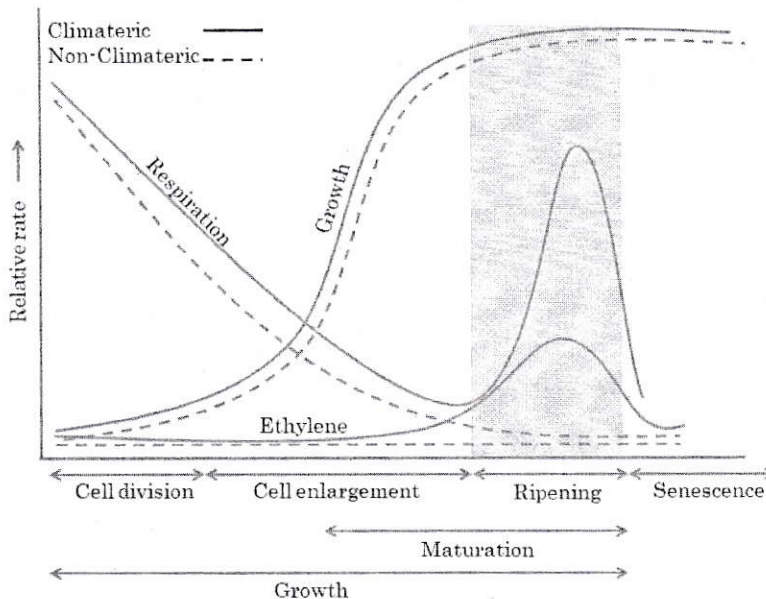


Figura 1: Perfil de crecimiento, respiración y producción de etileno durante el desarrollo, maduración y senescencia de frutos climatéricos y no climatéricos. El gráfico muestra la relación entre el crecimiento del fruto (eje de las abscisas) y la tasa relativa de respiración, crecimiento y biosíntesis de etileno (eje de las ordenadas), para frutos climatéricos (línea sólida) y no climatéricos (línea punteada). Se muestra resaltado en color plomo, las diferencias que se presentan durante la maduración del fruto. Frutos climatéricos aumentan su tasa de respiración y producción de etileno, mientras los frutos no climatéricos no presentan ese aumento. Modificado de Vijay y col., (2011).

En estudios de los patrones de acumulación de hormonas que se presentan durante el desarrollo de frutos no climatéricos se evidencia que el ABA aumenta sus niveles conforme el fruto va madurando, mientras que las auxinas, GA y brasinosteroides (BRs) disminuyen sus niveles durante la madurez del fruto (Symons y col., 2012) (Figura 2).

La hormona auxina estimula la expansión del receptáculo durante los primeros estadios de desarrollo del fruto y en estadios tardíos inhibe la maduración del fruto (Given y col., 1988), es así que se ha reportado una disminución en los niveles de auxina durante la maduración del fruto de frutilla *Fragaria x ananassa* (Nitsch 1950 y Symons y col., 2012)

(Figura 2). También en *F. x ananassa*, al agregar auxinas a la mitad del tiempo de desarrollo del fruto, se observa que el fruto no llega a madurar (Symons y col., 2012).

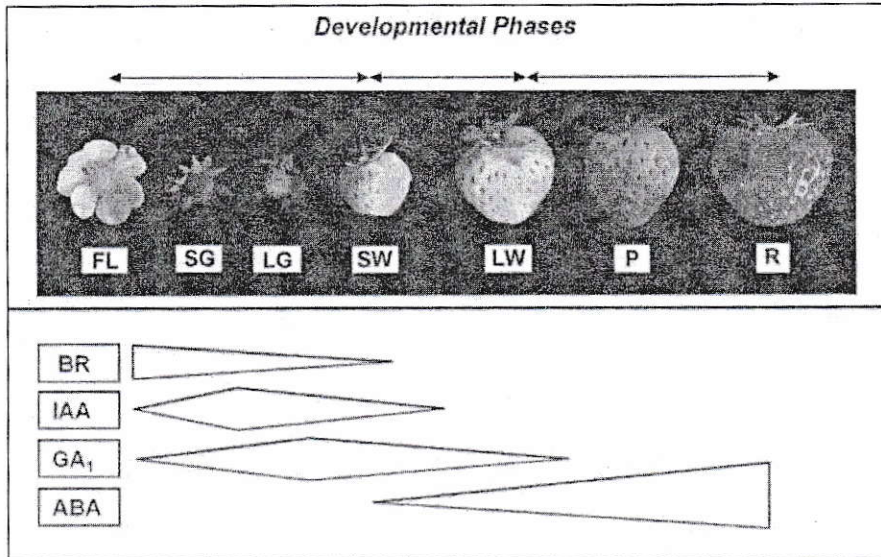


Figura 2: Representación esquemática de los niveles hormonales en los diferentes estadios del desarrollo del fruto de *Fragaria x ananassa*. Se muestran imágenes representativas de los distintos estadios del fruto y sus niveles hormonales que están representados por el ancho y alto de la figura geométrica de acuerdo a su temporalidad y abundancia, respectivamente. FL: flor; SG, verde pequeño; LG, verde grande; SW, blanco pequeño; LW, blanco grande; P, rosado; R, rojo. BR: brasinoesteroides; IAA: ácido indol acético; GA₁: ácido giberélico; ABA: ácido abscísico. Modificado de Symons y col., 2012

En frutos no climatéricos, ABA estaría cumpliendo un rol similar al que etileno cumple en frutos climatéricos, como aumentar el tamaño del fruto e incrementar los niveles de azúcar (Jia y col., 2011), por lo cual el incremento de esta hormona sería clave en el proceso de maduración del fruto. Además la aplicación exógena de ABA puede aumentar la coloración en frutos de uva (Ban y col., 2003). Al estudiar receptores de ABA como FaCHLH/ABAR y FaPYR se ve que al ser silenciados en frutos de *F. x ananassa*, los frutos no llegan a madurar aún después de tratamientos con ABA exógeno (Chai y

col.,2011; Jia y col., 2011), lo cual indicaría que la presencia de receptores de ABA es importante para que esta hormona pueda señalizar el proceso de maduración. No obstante, los mecanismos de señalización de ABA aún no se han descrito. Sin embargo en uva, el análisis del promotor GH3 identificado como un putativo elemento receptor de ABA (ABRE), indicaría que el contenido de ABA/auxina está relacionado con la iniciación de la maduración (Böttcher y col., 2010).

3.3. *Fragaria chiloensis* como modelo de estudio

La frutilla blanca, *Fragaria chiloensis* L. (Mill.) es una planta octoploide cultivada en Chile cuyo fruto es no climatérico. Su distribución va desde la región del Maule hasta Chiloé y su producción en campo se concentra en Curepto (VII Región), Chanco (VII Región), Contulmo (VII Región) y Purén (IX Región). Es parental de *Fragaria x ananassa* (frutilla comercial). *F. chiloensis* presenta resistencia a patógenos y tolerancia a condiciones de estrés abiótico como salinidad del suelo y baja temperatura (González y col., 2013). Actualmente esta especie es estudiada por ser un fruto de interés agronómico, ya que es considerado un fruto exótico debido a su color blanco, aroma y sabor intenso y muy agradable. En *F. chiloensis* se desconocen los genes que estarían regulando la maduración, y qué vías metabólicas actuarían en este proceso. Debido a esto, varios grupos de investigación se encuentran desarrollando estudios para conocer cuáles serían estos genes y su implicancia biológica durante los diferentes estados de maduración del fruto.

Para facilitar el estudio de los cambios de expresión génica en *F. chiloensis*, se caracterizó los estados de maduración del fruto y se clasificaron en base a características fenotípicas

cuatro estadios: C1: receptáculo verde- aquenio verde; C2: receptáculo verde- aquenio rojo; C3: receptáculo blanco- aquenio rojo y C4: fruto maduro (Figuroa y col., 2008) (Figura 3).

Usando esta clasificación, Pimentel y col., 2010 realizó un estudio de expresión génica diferencial mediante la construcción de librerías de hibridación sustractiva supresiva (SSH) en las que se identifican genes que están siendo expresados diferencialmente en un estadio particular del fruto. Gracias a estas librerías, se identificaron y validaron la expresión de genes de *F. chiloensis*, tales como pectato liasa, poligalacturonasa, endo-beta-4-1,4-gluconasa, proteínas de factores de respuesta a auxinas, entre otros (Pimentel y col., 2010). Esto demuestra que la estrategia ha sido satisfactoria. Bioinformaticamente se pudieron etiquetar genes basados en información de estas SSH, encontrándose así genes asociados a distintos procesos, y asociados a hormonas como ABA y auxina; se estudiaron tres de ellos en esta tesis de magíster.

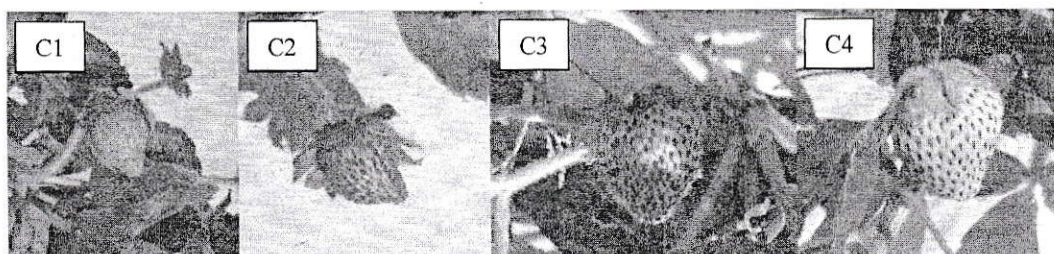


Figura 3: Estados de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*. Se definieron cuatro estados de maduración del fruto los cuales se clasificaron según las diferencias fisiológicas que presentaban: C1: receptáculo verde- achenio verde; C2: receptáculo verde- achenio rojo; C3: receptáculo blanco- achenio rojo y C4: fruto maduro. Caracterizados por Figueroa y col., 2008.

3.4. Posibles genes involucrados en la maduración de *Fragaria chiloensis*.

Las hormonas se sintetizan en la célula a través de diferentes vías metabólicas generando una respuesta en la planta a través de receptores y proteínas de respuesta.

De las fitohormonas presentes en el desarrollo del fruto, las auxinas y ABA tendrían mayor implicancia para el desarrollo de éste, ya que las auxinas estarían reprimiendo la maduración en estadios temprano del desarrollo, y en estadios tardíos del desarrollo llevarían al fruto a la madurez (Daminato y col., 2013; Figueroa y col., 2012). ABA estaría induciendo la maduración del fruto mediante el metabolismo de azúcares y aumento en los niveles de antocianinas (Jia y col., 2011). Por lo cual, ABA podría ser considerado un factor de control de maduración, porque sus niveles aumentan durante el proceso de maduración del fruto (Symons y cols. 2012).

En las librerías SSH antes mencionadas, a través de una búsqueda bioinformática en nuestro laboratorio, se encontraron tres distintos genes que posiblemente serían hormonalmente regulados por ABA o auxina. El primero de estos genes es un putativo receptor de ABA, perteneciente a la familia de las proteínas LANCL, la cual se encuentra descrita en animales y microorganismos (Sturla y col., 2009) y muestra una alta similitud

con un componente procariótico de la proteína lantionin sintasa C (LanC) (Chen & Ellis, 2008). Dentro de la familia génica de los LANCL, el fragmento del gen identificado en las SSH codifica una proteína que muestra mayor similitud con la proteína humana LANCL2, por lo cual la denominamos *FcLANCL2*. La funcionalidad de LANCL2 en glóbulos rojos humanos es unir ABA, el cual ingresa a través del canal Band 3, y la presencia de ABA intracelular activa a la enzima adenilato ciclasa resultando en un incremento de $[cAMP]_i$ y la subsecuente liberación de ATP, lo que generaría una respuesta vasodilatadora (Vigliariolo y col. 2015).

Las proteínas de la familia LANCL2 se caracterizan por poseer en su estructura 7 dominios transmembrana, dos sitios de unión a zinc y tres sitios activos para la correcta deprotonación de la molécula de afinidad y su correcta ciclación. Todos estos sitios están presentes en el producto génico de *FcLANCL2*, lo cual es un fuerte antecedente para proponer su función como un receptor de ABA en la frutilla. Como este posible receptor de ABA (*FcLANCL2*) aún no ha sido descrito en plantas, y ABA es una de las fitohormonas que regula la maduración del fruto, se consideró para el estudio dentro de esta tesis.

Otra fitohormona descrita en el proceso de maduración en frutos no climatéricos es la auxina. Dentro de las librerías SSH, se encontraron dos genes que presentan dominios conservados de respuesta a auxinas. Uno de ellos es un gen que codificaría para la proteína reprimida por auxina (ARP), por lo cual denominamos al gen encontrado *FcARP*. Este gen se caracteriza por codificar una proteína de bajo peso molecular entre 9 y 15 kda, poseer dominios reprimidos por auxina y asociados a dormancia (DRM) (Stafstrom y col., 1998). En otros modelos se ha descrito que este gen juega un rol importante en el

crecimiento y desarrollo de la planta (Lee y col., 2013), correlacionándose negativamente a la maduración de frutos (Reddy y col., 1990).

El nivel de expresión de este gen en *Pyrus pyrifolia* "pera asiática", PpARP, es inducido con IAA (Shi y col., 2013). La expresión de ARP de *Brassica rapa* en *Arabidopsis thaliana* reduce el crecimiento del tejido vegetativo y la productividad de semillas, por lo que se sugiere que BrARP1 podría actuar como regulador negativo en la maduración (Lee y col., 2013). Por estas razones, se decidió estudiar la expresión de FcARP durante el desarrollo de *F. chiloensis*.

Finalmente, se encontró un gen que posiblemente codifica una proteína del tipo SAUR (Small auxin up-regulated RNAs) que es diferencialmente expresado en las librerías SSH, al cual denominaremos *FcSAUR*. Se plantea que la familia de los SAUR son genes de respuesta primaria a auxinas y están involucrados en la vía de señalización de auxinas (Wu y col., 2013). Los genes de la familia SAUR se caracterizan por poseer un dominio conservado inducible por auxinas, carecer de intrones, poseer en la región 3' UTR elementos DST (Downstream destabilizing) e interesantemente un pequeño número de genes SAUR es reprimido por auxina (Ren y col., 2015). La función biológica de estos genes es muy diversa, pero se asocian principalmente al desarrollo y elongación de órganos (Spartz y col., 2014).

Es así que por la implicancia que posee ABA y auxina, jugando éstas un papel antagónico en el desarrollo de frutos no climatéricos, las diferentes características asociadas a los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*, de los cuales no se ha descrito el rol biológico, funcionalidad o regulación hormonal en frutos del género *Fragaria*, se encontró interesante

identificar estos genes y evaluar su perfil de expresión y su respuesta frente a hormonas exógenas a lo largo del desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis* que tiene un futuro promisorio en el mercado internacional por sus cualidades organolépticas.

4. Hipótesis

Dado los antecedentes antes expuestos se plantean las siguientes hipótesis:

En el fruto de *Fragaria chiloensis* los genes *FcLANCL2*, *FcSAUR* y *FcARP* poseen una expresión diferencial durante el desarrollo del fruto.

El gen *FcLANCL2* es regulado por ABA y auxina en el fruto de *Fragaria chiloensis* y codifica a una proteína que es receptora de ABA.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar de *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* genes con posible respuesta hormonal y evaluación de su expresión en los distintos estadios del desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*.

Evaluar la respuesta del gen *FcLANCL2* en el fruto de *F. chiloensis* a ABA y a auxina y la capacidad de su producto génico de ser un receptor de ABA.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar, aislar y cuantificar los niveles de expresión de los genes *FcLANCL2*, *FcSAUR* y *FcARP* en el fruto de *Fragaria chiloensis*.
2. Evaluar la respuesta del gen *FcLANCL2* frente a ABA y auxina en el fruto de *Fragaria chiloensis*.
3. Evaluar la capacidad de la proteína *FcLANCL2* de unir ABA en *Saccharomyces cerevisiae*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico

6.1.1. Frutos de *Fragaria chiloensis*

Los frutos de *Fragaria chiloensis* fueron colectados en el distrito de Purén IX Región, durante el mes de diciembre de los años 2012, 2013 y 2014, en la localización 38° 2'31.87"S y 73° 8'38.75"O. Eligiéndose frutos de los estadios de desarrollo C1, C2, C3 y C4 (Figuroa y col., 2008), lo cuales fueron guardadas a 4°C y trasladados al laboratorio para ensayos posteriores.

6.1.2. Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* DH5α para la amplificación de los vectores de clonación pCR8/GW/TOPO y de expresión en levaduras pAG426GPD-ccdB-EGFP. Las cepas obtenidas se detallan en la Tabla 1.

También se utilizaron las cepas DB3.1 que permiten la expresión de la toxina ccdB en bacterias, esto para la obtención de los vectores de expresión para levaduras. Las cepas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Cepas de *Escherichia coli* usadas en el desarrollo de la tesis de magister.

Cepa	Genotipo	Procedencia
DB3.1	F ⁻ gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl5 Δleu mt11	Life Technologies
DB3.1-si-EGFP	DB3.1;[pAG426GPD-ccdB-EGFP]	Este estudio
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Life Technologies
DH5α-FcLANCL2-ADNc	DH5α;[pCR8- FcLANCL2-ADNc]	Este estudio
DH5α-FcLANCL2-NST	DH5α;[pCR8- FcLANCL2-NST]	Este estudio
DH5α-FcLANCL2-NST-EGFP	DH5α;[pAG426GPD- FcLANCL2-NST-EGFP]	Este estudio
DH5α-FcSAUR-ADNc	DH5α;[pCR8- FcSAUR-ADNc]	Este estudio
DH5α-FcSAUR-ADNg	DH5α;[pCR8- FcSAUR-ADNg]	Este estudio
DH5α-ARP-ADNc	DH5α;[pCR8- FcARP-ADNc]	Este estudio
DH5α- ARP-ADNg	DH5α;[pCR8- FcARP-ADNg]	Este estudio

6.1.3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Como cepa nativa de *S. cerevisiae* se usó a BY4742 *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0* (WT, OpenBioSystem, Tabla 2) la cual fue transformada con los vectores de expresión en levadura pAG426GPD-FcLANCL2-NST-EGFP y pAG426GPD-ccdB-EGFP. Esto



permite la evaluación de la presencia del producto génico y su localización subcelular por medio de microscopia confocal.

Tabla 2: Cepas de *Saccharmyces cerevisiae* usadas en el desarrollo de la tesis de magister.

Cepa	Genotipo	Procedencia
WT	BY4742 MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0	OpenBioSystem, Hunstville, AL
WT- FcLANCL2-NST-EGFP	WT; [pAG426GPD-FcLANCL2-NST-EGFP]	Este estudio
WT-si-EGFP	WT; [pAG426GPD-ccdB-EGFP]	Este estudio

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

6.2.1.1. Extracción de ARN del fruto de *Fragaria chiloensis*

Se trabajó con los frutos de *Fragaria chiloensis* en los diferentes estadios de maduración C1, C2, C3 y C4 (Pimente, 2011). Para la extracción de ARN se pulverizaron 3 frutos de *F. chiloensis* con N₂ líquido en un mortero. Se tomó 1 gramo de tejido pulverizado y se agregaron 15 mL de solución tampón de extracción CTAB (CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 25 mM, NaCl 2M y espermidina 0.05%) y b-mercaptoetanol 2%. Se incubó por 15 minutos a 65°C mezclando por inversión. Terminado el tiempo de incubación se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó fuertemente hasta tener un aspecto lechoso. Posteriormente se centrifugó a 7317 x g

(COMBI 514R) a 4°C por 40 minutos. Terminado el tiempo de centrifugación se rescató el sobrenadante y se agregó ¼ del volumen de LiCl 10 M, y se dejó a 4°C por 12 horas.

Se centrifugó a 7317 x g por 40 minutos a 4°C, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 500 µL de solución tampón SSTE (NaCl 1 M, SDS 0.5%, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA pH 8.0 1 mM) a 65°C y 500 µL de etanol 70% frío con agitación suave. Luego se terminó el proceso de extracción de ARN usando las columnas de purificación de kit de extracción de ARN de EZNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron en el equipo NanoVue a una absorbancia de 260 (A₂₆₀). La pureza del ARN obtenido se determinó midiendo la absorbancia de 230 (A₂₃₀) y 280 (A₂₈₀), valores de máxima absorción para sales y proteínas, respectivamente. Las muestras seleccionadas para su posterior uso fueron las que tenían valores entre 1.8 y 2.2 al calcular el cociente entre A₂₆₀/A₂₃₀ y A₂₆₀/A₂₈₀. Las muestras se almacenaron a -80°C.

6.2.1.2. Extracción de ADN genómico de *Fragaria chiloensis*

Se empleó el método de Doyle and Doyle (1990) para la extracción de ADN genómico desde los frutos de *Fragaria chiloensis*. Para esto se empleó 1 g de tejido molido con N₂ el cual se incubó con 15 mL de solución tampón CTAB (CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2M y espermidina 0.05%) y b-mercaptoetanol 2%. Se incubó por 15 minutos a 65°C mezclando por inversión. Terminado el tiempo de incubación se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta tener un aspecto lechoso. Posteriormente se centrifugó a 7315 x g (COMBI 514R) a 4°C por 40 minutos y se rescató el sobrenadante. Se transfirió a tubos de 1.5 mL y se añadió

0.08 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M frío y 0.54 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló bien y se dejó incubando a -20°C por 1 hora. Luego se centrifugó por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 700 µL de etanol 70% frío y se centrifugó a 14.000 x g por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 700 µL de etanol 95% frío y se volvió a centrifugar a 14.000 x g por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento. Luego se agregó 100 µL de agua libre de nucleasas. Se cuantificó el ADN en el equipo NanoVue (Sección 6.2.1.1) y se almacenó a -20°C.

6.2.1.3. Extracción de ADN plasmidial de *Escherichia coli*

Para la extracción de ADN plasmidial de las cepas de *E. coli* transformantes se procedió a crecer las colonias en medio LB líquido (triptona 1.0%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%) con el antibiótico de selección, espectinomicina (100 µg/mL) o ampicilina (200 µg/mL) por al menos 16 horas. El cultivo se centrifugó por 10 segundos a 10.000 x g, descartándose el sobrenadante. Luego se agregó 300 µL de solución amortiguadora TENS (TRIS-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM, NaOH 0.1 M y SDS 0.5%) y se agitó fuertemente por 2 segundos. Luego se agregó 150 µL de acetato de potasio pH 4.3 3 M. Las muestras se centrifugaron por 2 minutos a 10.000 x g, sedimentándose el ADN cromosómico y residuos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó 900 µL de etanol 100% a temperatura ambiente. Posterior a esto se centrifugó por 2 minutos a 1.000 x g, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento 2 veces con 1 mL de etanol 80% previamente enfriado (-20°C). Por último se dejó secar el ADN plasmidial a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de nucleasas.

Para las muestras con que se realizaron digestiones enzimáticas o que fueron enviadas a secuenciar se realizaron miniprep usando el kit E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó las concentraciones del ADN mediante el equipo NanoVue, a una absorbancia de 260 (A_{260}).

6.2.2. Cultivo y transformación de *Escherichia coli*

6.2.2.1. Condiciones de cultivo *Escherichia coli*

Las células de *E. coli* se cultivaron en medio LB líquido (triptona 1.0%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%), con el antibiótico de selección correspondiente, a una temperatura de 37°C en agitación constante. Para obtener el LB sólido se suplementó el medio líquido con 1.5% de agar.

6.2.2.2. Obtención de *Escherichia coli* quimiocompetente.

Para la obtención de células de *E. coli* quimiocompetentes se partió con un stock de bacterias DH5 α el cual se inoculó en un volumen de 15 ml de medio LB y se dejó 16 horas agitando a 37°C. Se inoculó 1 ml de este cultivo en 250 ml de LB y se dejaron crecer a 28°C hasta alcanzar la DO_{600} de 0.3. Luego se centrifugaron a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml de solución tampón CCMB80 ($C_2H_3KO_2$ pH7 10mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 80 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 20 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mM y glicerol 10%) para resuspender suavemente las células y luego se completó con la solución CCMB80 hasta 20 ml. Se incubó en hielo por 20 minutos y luego se centrifugó a 2.000 x g por 8 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 5 ml de solución CCMB80, se midió la DO_{600} de una mezcla de 200 μ L de células

resuspendidas y 800 μL de LB. Se agregó CCMB80 a las células resuspendidas hasta alcanzar una DO_{600} entre 1 y 1.5. Se incubaron por 20 minutos en hielo y se alicuotaron 100 μL en tubos de 1.5 mL estériles y fríos. La suspensión de *E. coli* quimiocompetente se almacenó a -80°C .

6.2.2.3. Transformación de *Escherichia coli*.

Las células de *E. coli* quimiocompetentes preparadas en la Sección 6.2.2.2 se transformaron con ADN plasmidial mediante con un golpe térmico. Ésto se realizó agregando la ligación del gen con el vector de interés a 100 μL de células quimiocompetentes de *E. coli*. Se dejó incubar por 30 minutos en hielo, para luego proceder a dar un golpe térmico a 42°C por 45 segundos y de inmediato se colocó en hielo; de esta manera el vector ingresa a las células de *E. coli*. Luego se agregó 500 μL de medio LB y se dejó crecer a 37°C por 1 hora en agitación constante. Luego se sembró en placas con LB sólido suplementado con el antibiótico de selección, según corresponda (espectinomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego de 16 horas se observó la presencia de colonias resistentes al antibiótico, las cuales luego fueron analizadas para confirmar la presencia del plasmidio y sus características.

E. coli se transformó con el vector de clonación pCR8/GW/TOPO8, que permite obtener múltiples copias del fragmento que se ligó al vector.

También se transformó con pAG426-GPD-ccdB-EGFP, vector que permite generar proteínas de fusión en levaduras. Este vector está diseñado para generar proteínas de fusión con la proteína EGFP en el carboxilo terminal de la proteína de interés. Tanto el

vector pCR8-FcLANCL2-NST como pAG426-GPD-ccdB-EGFP son de la tecnología Gateway por lo que se procedió a recombinar ambos vectores. Con la reacción producto de la recombinación se transformó *E. coli* quimiocompetente (Sección 6.2.2.3.), usando como antibiótico de selección ampicilina 200 µg/mL. Las colonias se dejaron crecer por 16 horas a 37°C. De las colonias obtenidas se seleccionaron 10, se extrajo el ADN plasmidial (Sección 6.2.1.3.) y se realizaron ensayos con enzimas de restricción (Tabla 8). Para pAG426-GPD-ccdB-EGFP, se empleó EcoRI que genera fragmentos de 6877 pb y 1274pb y NcoI que genera fragmentos de 4796 pb y 3352 pb (Figura 18.A). Para pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP, se empleó XhoI que lineariza el vector y da un fragmento de 9031 pb, y SspI que genera fragmentos de 992 pb, 1177 pb, 1670 pb, 2362 pb y 2630pb. Además la doble digestión de XhoI y SspI que genera los fragmentos 730 pb, 940 pb, 992 pb, 1177 pb, 2362 pb y 2630 pb (Figura 18. B):

6.2.3. Cultivo y transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

6.2.3.1. Condiciones de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2% y agar 2% en caso de YPD sólido), y las cepas transformantes en YMM (YNB 0.167%, (NH₄)₂SO₄ 0.501%, glucosa 2%, mezcla de aminoácidos 1 (Tabla 3) 0.07%, mezcla de aminoácidos 2 (Tabla3) 0.045% y agar 1.5% para YMM sólido) a una temperatura de 30°C con agitación constante.

Tabla 3: Composición de la mezcla de aminoácidos usados. Cada mezcla contiene 1gr de cada aminoácido indicado.

Mezcla de Aminoácidos 1	Mezcla de Aminoácidos 2
Alanina	Ácido aspártico
Arginina	Histidina
Cisteína	Isoleucina
Leucina	Metionina
Lisina	Fenilalanina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
	Tirosina
	Valina

6.2.3.2. Obtención de *Saccharomyces cerevisiae* quimiocompetente

Las células de *S. cerevisiae* quimiocompetentes se obtuvieron mediante la modificación del protocolo descrito por Gietz y Woods, 2002. Para esto se inoculó una colonia de levadura BY4742 proveniente de una placa en 15 mL de YPD líquido. Se incubó a 30°C hasta una DO₆₀₀ de 1. Estos 15 mL se inocularon en un cultivo de 300 mL de medio YPD, y se creció a 30°C hasta una DO₆₀₀ de 0.2 a 0.3. Luego se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos a 4°C, y el sedimento obtenido se lavó 2 veces con agua destilada estéril fría centrifugando a 1.000 x g por 10 minutos. Por último se resuspendió el sedimento en 1.5 ml de solución de acetato de litio 100mM en TE pH7. De esta forma se obtuvieron las

levaduras competentes, las cuales se mantuvieron en hielo y se procedió a la transformación.

6.2.3.3. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la transformación de *S. cerevisiae* se usó 1 µg del plasmidio, 100 µg de ADN de espermio de salmón denaturado a 100°C por 10 minutos y 100 µL de *S. cerevisiae* quimiocompetentes (Sección 6.2.3.2), las cuales se mezclaron invirtiendo el tubo. A esto se agregó 600 µL de solución de polietilenglicol con acetato de litio (Acetato de litio 100mM, TE pH 7.5 y polietilenglicol 3350 40%) preparada al momento de usar y esterilizada por filtración. Esto se agitó vigorosamente y se dejó incubando por 30 minutos a 30°C con agitación constante. Luego se agregó 70 µL de DMSO 100% estéril, invirtiendo el tubo para mezclar y se enfrió en hielo por 10 minutos. Se incubó a 42°C por 15 minutos, y luego rápidamente se enfrió en hielo por 5 minutos. Se centrifugó 5 segundos a 10.000 x g y se retiró el sobrenadante. El sedimento de levaduras se resuspendió en 1 mL de YMM y se incubó 16 horas a 30°C en agitación constante. Se sembró 100 µL de la suspensión de levaduras en placas con YMM sólido y se incubaron a 30°C. Luego de 2 o 3 días se evaluaron las colonias transformantes.

6.2.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa y purificación de bandas.

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa (SeaKem® Le Agarose- Lonza) Este gel fue preparado en solución tampón TAE (ácido acético 0.1142%, Tris-HCl 40 mM y EDTA pH 8.0 2 mM). Las muestras se cargaron en el gel con tampón de carga (azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de

90V por 40 min para los productos de PCR y 90 min para las digestiones enzimáticas. El ADN se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (GeneGenius Classic, SynGene) a una exposición de 200 ms.

La purificación de bandas de ADN en gel de agarosa se realizó haciendo uso del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2.5 Electroforesis en gel denaturante de ARN de *Fragaria chiloensis*

Se preparó un gel de 1.5% de agarosa con solución tampón MOPS (MOPS 400 mM, acetato de sodio 100 mM, EDTA 10 mM) y formaldehído en solución 3%. Se denaturó 1 µg en ARN a 80°C por 10 minutos junto a la solución de carga (formamida desionizada 62.5%, formaldehído 1.14 M, azul de bromofenol 200 µg/ml, xilen cianol 200 µg/ml y bromuro de etidio 50 µg/ml en MOPS-EDTA-acetato de sodio 1.25%) y luego se cargaron las muestras en el gel. La electroforesis se realizó en solución MOPS a 70V por 40 minutos. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (GeneGenius Classic, SynGene) a una exposición de 200ms. En el gel se observaron las bandas correspondientes a 28S y 18S.

6.2.6 Síntesis de ADN complementario desde ARN de *Fragaria chiloensis*

Las muestras de ARN obtenidas con óptima calidad según la sección 6.2.1.1 fueron tratadas con DNAsa para eliminar posibles remanentes de ADN genómico. Cada reacción se realizó con 5 µg de ARN total en un volumen de reacción de 15 µL en agua libre de nucleasas. El tratamiento con DNAsa tenía una concentración final de 1 X Tampón DNAsa I (Ambion) con MgCl₂; 1 U DNAsa I (Ambion); 1,2 U de inhibidor de RNasa

RiboLock™ (Fermentas). La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C e inmediatamente se procedió a inactivar la enzima con EDTA 1 mM a 65°C por 10 minutos y 75°C por 5 minutos.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema ImProm-II® Reverse Transcription de Promega. Se mezcló 2 µg de ARN libre de ADN con 0.3 µM de partidor antisentido Oligo-AP. Esto se incubó por 30 minutos a 70°C, y luego se agregó el mix para la transcripción reversa a una concentración final de: 1X tampón ImProm-II®, MgCl₂ 10 mM, dNTPs 0,8 mM, inhibidor de RNasa RiboLock 1,5 U y agua libre de nucleasa para un volumen final de 19 µL. Finalmente, se añadió 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa a cada tubo. El programa que se usó para la transcripción reversa fue: 5 min a 25°C, 90 min a 42°C, 15 min a 70°C y 15 min a 4°C. El producto de la síntesis de ADNc se almacenó a -20°C

Se confirmó la calidad del ADNc obtenido mediante la amplificación por PCR de *FcANS* (1174 pb), gen que codifica para antocianidin sintasa, utilizando partidores específicos y el programa detallado en la Tabla 4 y 5. Confirmada la integridad del ADNc éste quedó disponible para PCR cuantitativo en tiempo real.

6.2.7. Diseño de partidores para amplificar los genes de interés.

Los partidores que se usaron en el desarrollo de esta tesis para obtener la secuencia de ADN genómica y el marco de lectura abierto de los genes en estudio, fueron diseñados basándose en la secuencia del genoma de *Fragaria vesca*, tomando desde el ATG inicial hasta el codón de término del marco de lectura abierto del gen. Los partidores de qRT-PCR fueron diseñados haciendo uso del programa GenScript (<http://www.genscript.com>).

Para el diseño de los partidores se tuvieron en cuenta parámetros como temperatura media de unión del partidador (60°C) y porcentaje de guaninas y citocinas (entre 40% y 60%).

Para la obtención de las versiones del marco de lectura abierto de los genes en estudio sin el codón de término (TGA, TAA o TAG), éste se reemplazó, en el partidador correspondiente, por un codón que codifique para un aminoácido radical pequeño (glicina o serina) y no cargado. De esta manera se permitirá expresar las proteínas de fusión evitando alteraciones en su conformación.

Los partidores diseñados fueron los siguientes:

Tabla 4: Partidores usados para el desarrollo de esta tesis de magister.

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Observaciones
FcLANCL2f	ATGCCGGATTTTCGTTGAAGA	Amplifica el marco de lectura abierto del gen <i>FcLANCL2</i> Para la secuencia de ADN complementario da un largo de 1185 pb.
FcLANCL2r	CAAGACAGAACAAGGTTTCAG	
qFcLANCL2f	GAAGGATGCATGGAGGTGAT	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 86 pb dentro del marco de lectura abierto del gen <i>FcLANCL2</i>
qFcLANCL2r	TGGGTCAGTCATGTCCAGAA	
FcLANCL2-nst	TCCAAGTTCATAACCAGGAAACC	Partidor reverso usado para obtener la secuencia de <i>FcLANCL2</i> sin el codón de término.
FcARPf	ATGCTCAGGAAGGTCCCTCA	Amplifica el marco de lectura abierto del gen <i>FcARP</i> . Usado para la versión de ADN genómica (568pb) y ADN complementario (261pb).
FcARPr	GCTAGCTTGTCACCTTAACG	
qFcARPf	AGACGAGGAGCAAGCATCAT	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 118 pb dentro del marco de lectura abierto del gen <i>FcARP</i> .
qFcARPr	AACCAACAACGTGGCATAACA	

FcARP-nst	TCCACGATGATGCTTGCTCC	Partidor reverso usado para obtener la secuencia de <i>FcARP</i> sin el codón de término.
FcSAURf	ATGGCGAAAGGTGGAAAGCT	Amplifica el marco de lectura abierto del gen <i>FcARP</i> . Usado para la versión de ADN genómica (374pb) y ADN complementario (374pb).
FcSAURr	GATCAGCAAGCGTAGAACTC	
qFcSAURf	GACGACGACGACTCAATCAA	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 132pb dentro del marco de lectura abierto del gen <i>FcSAUR</i> .
qFcSAURr	TCTCGATCAGCAAGCGTAGA	
FcSAUR-nst	GAGCAAGCGTAGAACTCGAC	Partidor reverso usado para obtener la secuencia de <i>FcSAUR</i> sin el codón de término.
FcANSf	ATGGTGACTGCTGCATCCG	Amplifica el marco de lectura abierto del gen <i>FcANS</i> . Usado para la versión de ADN genómica (1174pb) y ADN complementario (1248 pb).
FcANSr	CAGCGCTTGATTGATGAAGCAGCTA	
qFcNCEDf	GTTCAAGCTGCAGGAGATGA	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 126 pb del gen <i>FvNCED</i> (LOC101315210).
qFcNCEDr	GGCGACTCAACCCAGATTAT	
qFcARF2f	AAGTCTACTGCACGACCAGC	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 92 pb del gen <i>FvARF2</i> (LOC101312532).
qFcARF2r	CCCAGAGGGCATCCAGTTATC	
qFcRIB413f	ACCGTTGATTTCGACAATTGGTCATCG	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican para el gen <i>FaRIB413</i> (gene33863) un fragmento de 149 pb.
qFcRIB413r	TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG	
qFcGAPDH1f	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 121 pb del gen <i>FaGAPDH1</i> (gene18492).
qFcGAPDH1r	AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG	
qFcGAPDH2f	CCCAAGTAAGGATGCCCCATGTTTCG	Partidores usados para qRT-PCR, que amplifican un fragmento de 117 pb del gen <i>FaGAPDH2</i> (gene07104).
qFcGAPDH2r	TTGGCAAGGGGAGCAAGACAGTTGGTAG	
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	Partidores universales que amplifican en el vector pCR8/GW/TOPO.
M13R	AACAGCTATGACCATG	
EGFP-F	CGTAAACGGCCACAAGTTCA	Amplifica un fragmento de 411 pb de la secuencia que codifica a
EGFP-R	TTCTGCTTGTCGGCCATGAT	

		la proteína fluorescente verde(GFP).
--	--	--------------------------------------

6.2.8. Amplificación del marco de lectura abierto mediante PCR.

Los distintos genes en estudio se amplificaron mediante la enzima de alta fidelidad Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent Technologies, Inc. Cada reacción tuvo una concentración final de: tampón de polimerasa 1X, MgCl 1.5 mM, dNTP 200 μ M, 250 nM de partidores en sentido y antisentido y ADN 10 ng. Se emplearon los programas que se detallan en la Tabla 5. Terminado el programa de PCR se sometió a electroforesis los amplificados en un gel de agarosa al 1.5% según la sección 6.2.4.

Tabla 5: Programas de amplificación para los diferentes genes usado en el desarrollo de esta tesis.

Programa de PCR para <i>FcANS</i> , <i>FcLANCL2</i> y M13			
Ciclo	Paso	Temp (°C)	Tiempo
1	1	95	10'
35	2	95	45"
	3	55	45"
	4	72	1'30"
1	5	72	7'
1	6	10	∞

Programa de PCR para <i>FcSAUR</i> , <i>FcARP</i> y <i>EGFP</i>			
Ciclo	Paso	Temp (°C)	Tiempo
1	1	95	5'
35	2	95	45"
	3	55	45"
	4	72	45"
1	5	72	7'
1	6	10	∞

6.2.9. Clonación de genes en estudio en vectores de clonamiento utilizando la tecnología Gateway.

Para la clonación del marco de lectura abierto y la secuencia de ADN genómico de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*, se realizó electroforesis del producto de la amplificación del gen por PCR y se purificó la banda obtenida según la sección 6.2.4. Este producto se adeniló, agregándole dATP 1 μ M por 30 minutos a 70°C, y se ligó al vector de clonación pCR8/GW/TOPO, agregando 150 ng de la secuencia de interés a 0.5 ng del vector linealizado, NaCl 200 mM y MgCl₂ 10 mM. Esto se dejó incubar por 16 horas a 4°C. Para aislar el vector que incorporó el inserto correctamente, se transformó con esta reacción células quimiocompetentes de *E. coli*, según la sección 6.2.2.3. Al día siguiente se observaron colonias resistentes al antibiótico de selección, espectinomomicina 100 μ g/mL o ampicilina 200 μ g/mL.

Para verificar que la clonación haya sido satisfactoria se procedió a verificar la presencia del gen de interés en el vector. Para esto se extrajo el ADN plasmidial (Sección 6.2.1.3.) y se realizó PCR con partidores específicos para el gen siguiendo el protocolo de la sección 6.2.8.

La direccionalidad del inserto se verificó mediante ensayos con enzimas de restricción. Cada reacción tuvo una concentración final de 1U de enzima, 100ng de plasmidio y 1X tampón de enzima. Esta reacción se incubó a 37°C por 18 horas. Los productos de esta

digestión enzimática fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90V por 90 min.

6.2.10. Secuenciación de genes en estudio y análisis de resultados.

Los plasmidios que incorporaron correctamente el gen se enviaron a secuenciar a Macrogen USA Corp, usando partidores universales M13 que se encuentran en el vector pCR8/GW/TOPO. Se enviaron de 1 a 3 clones para cada gen en sus distintas versiones (ADN complementario y genómico).

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados bioinformaticamente con el programa BioEdit. También se compararon las secuencias provenientes de ADN complementario con las del ADN genómico, encontrándose las regiones no codificantes o intrónicas. Con las secuencias provenientes del ADN complementario se realizó BlastN y BlastP en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. y se realizó un árbol de semejanza con otras secuencias que presentaran alta identidad.

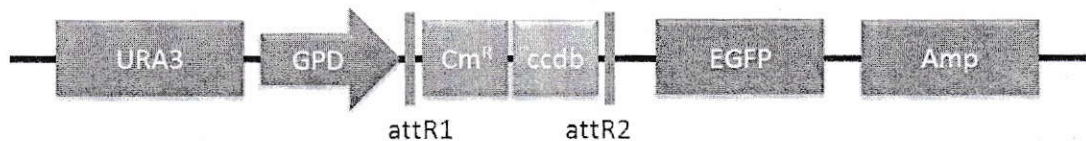
6.2.11. Expresión de FcLANCL2 en *Saccharomyces cerevisiae*

6.2.11.1. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con pGPDFcLANCL2-EGFP

Con el fin de poder expresar la proteína codificada por el gen FcLANCL2 se recombinó, mediante la tecnología Gateway, el gen en sentido desde el vector de entrada (pCR8/GW/TOPO) en el vector de destino para expresión de proteínas en levaduras

(pAG426-GPD-ccdB-EGFP). Para esto se usó 100 ng del vector de entrada, 200 ng del vector de destino y 1 μ L del LR Clonase $\text{\textcircled{R}}$ Invitrogen. Se incubó por 3 horas a 26°C y se finalizó la reacción agregando 5 μ M de Proteínasa K a 37°C por 10 minutos, para inactivar la reacción.

pAG426GDP-ccd-EGFP



pAG426GDP-FcLANC-LIKE2-EGFP

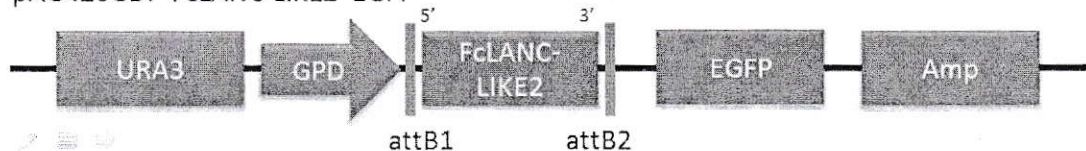


Figura 4: Construcciones obtenidas para los vectores de expresión de proteínas en levaduras.

Luego de la recombinación se transformaron células de *E. coli* siguiendo la metodología detallada en la sección 6.2.2.3. Se usó ampicilina (200 μ g/mL) como antibiótico de selección y se crecieron en medio LB sólido. A las colonias de *E. coli* obtenidas se les extrajo ADN plasmidial (Sección 6.2.1.3) y se analizó mediante PCR la presencia del gen *FcLANCL2* y *EGFP* (Sección 6.2.8).

De las colonias de *E. coli* que hayan presentado el inserto en sentido luego de la clonación con el producto de la recombinación, se purificó el ADN plasmidial (Sección 6.2.1.3) y

se procedió a transformar *S. cerevisiae* quimiocompetente según lo descrito en la Sección 6.2.3.3, con el plásmido con el gen inserto (pAG426-FCLANCL2-EGFP) y sin el gen inserto (pAG426-ccdB-EGFP). Esto con el fin de poder usarlo como control negativo en todos los ensayos, ya que la cepa de levadura usada (BY4742) es seleccionada mediante la auxotrofia de ésta al amino ácido Uracilo (Pronk y col., 2002). Este control negativo también fue usado en los experimentos con ABA exógeno. Las células de *S. cerevisiae* se crecieron en medio YMM sólido y luego de 2 días se observaron colonias, las cuales se analizaron molecularmente.

6.2.11.2. Análisis de localización subcelular de la proteína FcLANCL2-EGFP en *S. cerevisiae*.

Las levaduras que se transformaron con el plásmido pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP fueron observadas al microscopio confocal Zeiss LMS 710. Para esto crecieron las colonias a analizar en medio YMM líquido por 24 horas, y se cargaron 5 µL de éste en un portaobjetos. Las levaduras fueron excitadas por un laser de 488 nm de longitud de onda. La emisión de la fluorescencia de GFP fue capturada de 505 a 530 nm de longitud de onda. Este experimento se realizó 3 veces para cada colonia transformante seleccionada.

6.2.11.3. Tinción con el marcador vacuolar FM4-64.

La tinción con FM4-64 permite marcar las membranas celulares involucradas en la endocitosis, y en tiempos largos de incubación marca la membrana vacuolar (Baggett y col., 2003). Las levaduras transformadas con pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP fueron crecidas por 24 horas en medio YMM líquido con 3 μ M FM4-64, con agitación constante a 30°C. De esta manera el FM4-64 delimita la membrana de la vacuola. Las levaduras se excitaron a 514 nm de longitud de onda para visualizar FM4-64 y a 488 nm de longitud de onda para EGFP. En tanto la captura de la emisión fue de 505 a 530 nm para EGFP y de 560 y mayores para FM4-64. Este experimento se realizó 3 veces para cada colonia transformante.

6.2.11.4. Detección de proteínas mediante Western Blot

6.2.11.4.1. Extracción de proteínas totales de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se cultivaron las levaduras en medio YMM líquido hasta la fase exponencial ($DO_{\lambda 600} = 3$) y se sedimentó a 3.000 x g por 10 min a 4°C y se lavó con una solución de azida de sodio (NaN_3 10 mM). Luego se trataron las células con una solución de lisis en razón de 200mg de células sedimentadas por ml de solución de lisis, compuesta por CelLytic Y (Yeast Cell Lysis/Extraction reagent, Sigma), bolitas de vidrio de 425-600 μ m (Sigma), DTT 7mM e inhibidores de proteasas 1X final (Complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Las levaduras incubadas en esta solución se mantuvieron en hielo, y se agitaron vigorosamente con el equipo Mini-Beadbeater-16 (Bio Spec Product Inc.) por 30 segundos y después 30 segundos en hielo. Esto se repitió por 15 ciclos. Posteriormente a

esto se centrifugó a 14.000 xg por 10 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante que es donde se encuentran las proteínas. Las proteínas se cuantificaron según el método de Bradford.

6.2.11.4.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida para identificar las proteínas extraídas desde las levaduras. Estos geles estaban compuestos por un gel separador de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl pH 8.8 375 mM, acrilamida-bis-acrilamida 10%, SDS 0.1%, APS 0.1% y TEMED 0.06%), el cual se dejó polimerizar entre dos placas de vidrio con 1 mm de separación, y se agregó agua para evitar la formación de burbujas. Luego se retiró el agua y se agregó el gel concentrador al 5% (Tris-HCl pH6.8 125 mM, acrilamida-bis-acrilamida 4%, SDS 0.1%, APS 0.1% y TEMED 0.06%). Durante todo el proceso se evitó la formación de burbujas. Los volúmenes de carga se prepararon mezclándolos extractos proteicos de cada muestra con solución de carga 5x(Tris-HCl pH8 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 28.8mM, azul de bromofenol 0.1%). Esta mezcla se incubó a 70°C por 15 minutos, con el objetivo de denaturar las proteínas. Se usaron estándares de peso molecular para proteínas pre-teñidos (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) y regular (PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas). La electroforesis se realizó en solución de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%p/v) a un voltaje constante de 70V por 30 minutos y luego se aumentó el voltaje a 100V por 2 horas.

Para visualizar el patrón de bandas de proteína, el gel se sumergió en solución de fijado (metanol 50% y ácido acético glacial 10%) por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se cubrió con solución de tñido (metanol 50%, ácido acético glacial 10% y azul de Comassie 0.1%) y se dejó a temperatura ambiente en agitación constante por al menos 2 horas. Luego se agregó la solución de desteñido (metanol 40% y ácido acético glacial 10%) hasta que el fondo del gel esté totalmente desteñido y se aprecien las bandas de proteínas.

6.2.11.4.3. Western Blot en membrana de nitrocelulosa

Un gel obtenido según la sección 6.2.11.4.2. se cubrió con solución tampón de transferencia Bjerrum/Schafer-Nielsen (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375% y Metanol 20%) por 10 minutos en agitación constante. Luego se traspasó a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca, a un voltaje constante de 15V por 15 minutos.

Para verificar que las proteínas se hayan transferido correctamente, al terminar la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Ponceau S 0.2%, ácido tricloroacético 30% y ácido sulfosalicílico 30%) por 1 minuto y luego se enjuagó con agua bidestilada hasta que toda la tinción haya sido removida.

La membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo compuesta por TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl pH 8.0 150 mM y Tween-20 0.05%) suplementado con leche 5%. Luego se enjuagó la membrana por 5 segundos con TBS-T.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti eGFP producido en ratón (Thermo Scientific) en la dilución de 1:5000 en solución TBS-T con leche al 1%. Esto se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y luego la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos, cada vez, en solución TBS-T. Como anticuerpo secundario se usó anti-mouse-IgG Peroxidase (Invitrogen) en la dilución de 1:10000 en solución TBS-T con leche al 1%. Se dejó incubando la membrana por 2 horas a temperatura ambiente y se enjuagó 3 veces por 10 minutos cada vez con solución TBS-T.

La membrana de nitrocelulosa se reveló usando el kit SuperSignal™ West Fento Maximum Sensitivity Substrate (Life Technologies) y se usaron placas radiográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare Life Sciences) para capturar la emisión obtenida por el sustrato quimioluminiscente. Se dejó 1 minuto la placa radiográfica sobre la membrana de nitrocelulosa. Luego la placa radiográfica se sumergió por 1 minuto en solución de revelado, se enjuagó en agua y se sumergió en la solución de fijado, enjuagándose con agua nuevamente. Terminado esto, la placa radiográfica se dejó estilando.

6.2.12 Ensayos de unión

6.2.12.1. Obtención de esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los esferoplastos son células de levadura a las cuales se les ha removido la pared celular. Para obtener esferoplastos se crecieron en medio YMM líquido cultivos de levaduras transformadas con los plasmidios pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP hasta que se alcanzaron la fase exponencial ($DO_{\lambda 600} = 3$). Se centrifugó por 10 minutos a 4 000 RPM en la centrifuga Sorvall™. Las células sedimentadas se resuspendieron en azida de sodio (NaN_3) 10 mM y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 4000 RPM. Se resuspendió en un volumen pequeño de azida de sodio 10mM, y se agregó el mismo volumen de solución tampón de esferoplastos 2X (Sorbitol 2.8 M, fosfato de potasio pH7.5 0.1 M y Azida de sodio 10 mM), 200 μ L β -mercaptoetanol y 0.6 unidades/mL de Zymoliase® 100T (Seikagaku Corporation). Se incubó a 37°C con

agitación suave. Los esferoplastos son frágiles osmóticamente y se lisan si se transfieren a una solución hipotónica. Usando este principio se verificó periódicamente la efectividad del tratamiento con Zymoliase evaluando la lisis celular al agregar 10 μ L de la suspensión en 1 ml de agua y cuantificar $DO_{\lambda 600}$. Esto hasta que la $DO_{\lambda 600}$ obtenida sea la mitad a la inicial. Las células se centrifugaron a 4.000 RPM por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 20 ml de solución tampón de membrana (Sorbitol 0.8M, EDTA 1mM y trietanolamina/ácido acético pH 7.1 10mM) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM. Se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford, y se almacenaron a 4°C.

6.2.12.2. Ensayo de unión de [³H]-ABA a esferoplastos

Para determinar si la proteína FcLANCL2-EGFP une ABA se procedió a incubar los esferoplastos (sección 6.2.12.1) con [³H]-ABA (DL-CIS, TRANS-[G-³H]-ABA (Perkin Elmer), y así cuantificar la unión a esta hormona que haya ocurrido en las levaduras transformadas con los plasmidios pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP.

Para esto se empleó 500 μ g de proteína de esferoplastos de cada una de levaduras transformadas con los plasmidios pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP, los cuales se incubaron por 30 minutos a 25°C en la solución tampón de unión (Tris-HCl pH7.3 25 mM, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM) suplementada con [³H]-ABA 0.2 μ Ci (Perkin Elmer) y tritón 0.1%. El control negativo

en que levaduras sin transformar fueran incubadas con ABA, no se usó ya que no hay referencias de que el gen FcLANCL2 se haya encontrado en levaduras. Además se usaron dos concentraciones de (\pm)ABA 100 nM y 1 μ M, para evaluar la eficiencia de la proteína al unir ABA. Terminado el tiempo de incubación, se filtró en membranas MF-Millipore, de ésteres mezclados de celulosa, hidrófila, con un poro de 0,45 μ m de diámetro (Millipore), las cuales se secaron en oscuridad y luego se agregó el líquido de centelleo Ecoscint ORIGINAL (National Diagnostics). Los centellos debido a la radioactividad fueron cuantificados en el equipo Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer. Se realizó 1 réplica biológicas de este ensayo con tres réplicas técnicas cada una.

6.2.13. Tratamientos hormonales en los frutos de *Fragaria chiloensis*.

Los frutos fueron sumergidos en la solución tampón A (ácido cítrico 0.06 M, Na₂HPO₄ 0.074 M, DMSO 2% y DTT 5 mM, pH4.5) en condición control y para los tratamientos hormonales esta solución se suplementó con ABA 1mM o NAA 1mM, según Opazo y col., 2013.

Para realizar este ensayo se seleccionaron un total de 108 frutos para los tratamientos de ABA (36), NAA (36) y el control (36). Para cada tratamiento se consideraron 3 réplicas biológicas, las cuales estaban compuestas de 3 frutos cada una. Estos frutos fueron sumergidos por 10 minutos en la solución tampón A (Opazo y col., 2013), con la hormona o sin ella según corresponda. Terminado este tiempo, los frutos se sacaron y se tomó un primer tiempo T₀ y se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Los demás

frutos fueron congelados y almacenados a 30 minutos, 1 hora y 12 horas luego del término de la aplicación hormonal, determinándose así los tiempos T₁, T₂ y T₃.

Se extrajo ARN de estos frutos (Sección 6.2.1.1.) y se realizó electroforesis en gel de agarosa denaturante para verificar la integridad de éstas (Sección 6.2.5.). Se visualizaron dos bandas definidas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S, con lo cual se infiere la integridad del ARN mensajero. Observada la integridad de ARN se procedió a tratarlo con DNAsas para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico que pudiera interferir posteriormente. Para verificar que se haya eliminado el ADN se amplificó el gen *FcANS* mediante PCR, usando el ARN libre de DNAsas como templado.

6.2.14. Evaluación de niveles de transcrito mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) de los genes en estudio.

Para evaluar la acumulación del transcrito de los diferentes genes presente en el fruto de *Fragaria chiloensis*, en los diversos estadios y luego de los tratamientos hormonales se realizaron experimentos de qRT-PCR utilizando la sonda fluorescente SYBR green contenida en el kit SensiMix™ SYBR Hi-Rox (Bioline) y se empleó el termociclador *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies).

Se diseñaron partidores específicos para *FcLANCL2*, *FcSAUR*, *FcARP* (Sección 6.2.7) y se utilizaron partidores descritos en la literatura para *FcRIB413*, *FcGAPDH1*, *FcGAPDH2* (Amil-Ruiz y col. 2013) como adecuados genes de mantenimiento (housekeeping) en la especie de *Fragaria vesca*. Para el caso de tratamientos hormonales y para corroborar que

el tratamiento haya funcionado, se utilizaron genes marcadores de respuesta a hormonas como *FcNCED* (ABA) y *FcARF2* (auxina) (Jeong-Hwan Mun y col., 2012) (Sección 6.2.7)

Se determinó la eficiencia de cada par de partidores para amplificar los fragmentos de interés. Para esto, se realizó una reamplificación mediante PCR en tiempo real para cinco diluciones (desde 1/100 hasta 1/1*10⁶) de una amplificación realizada previamente por PCR convencional, utilizando cada par de partidores independientemente, esto para que la concentración del templado inicial sea mayor a que si se usara como templado ADN complementario. Luego, la eficiencia de cada partidador (E) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde la pendiente se obtiene de la recta en un gráfico del ciclo umbral (Ct) v/s la dilución.

Una vez obtenida las eficiencias de los partidores, se realizaron las reacciones de qRT-PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizaron 250 nM del partidador en sentido y antisentido para la amplificación del fragmento de los genes antes mencionados, 1 X SensiMix™ SYBR Hi-Rox (Bioline) que posee todos los componentes necesarios para realizar la reacción de qRT-PCR incluyendo la sonda SYBR® Green y dNTPs, además de ADN complementario usado fue a una concentración final de 0.5 ng. El programa utilizado fue el mismo para todas las reacciones de qRT-PCR (Tabla 8).

Luego de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, que consistió en la medición de la fluorescencia durante la denaturación del producto de PCR (95 °C por 10", 50 °C por 5", 70°C por 1" y 95 °C por 1"). La presencia de un único pico en un gráfico de fluorescencia versus temperatura fue indicativo de la presencia de un solo amplificado en la reacción. Para comprobarlo además, se realizó electroforesis a los productos de la amplificación mediante qRT-PCR.

Tabla 6: Programa de q RT-PCR usado para todos los partidos usados.

Ciclos	Paso	Tem(°C)	Tiempo
1	1	25	1'
1	2	95	10'
40	3	95	15"
	4	60	15"
	5	72	15"
1 (Curva de disociación)	6	95	10"
	7	50	5"
	8	70	1"
	9	95	1"

La metodología utilizada requiere de una condición que sirve como "calibrador", la cual corresponde a las condiciones normales o sin tratamiento. En esta tesis el calibrador correspondió al estadio C1 en los qRT-PCR donde se midieron los niveles de expresión del transcrito de los diferentes estadios de desarrollo, y al control T₀ en los tratamientos hormonales.

La cuantificación se realizó utilizando los datos de Ciclo Umbral obtenidos mediante el programa *MxPro Software*. Los datos se ingresaron a la Ecuación 2 (Pfaffl, 2001), junto a los valores de eficiencia de cada par de partidores, que fue determinado previamente.

(Ecuación 2)

$$Razón = \frac{(1 + E_{gen..objetivo}) \times e^{(Ct_{gen..objetivo} - Ct_{calibrador.objetivo})}}{(1 + E_{gen..normalizador}) + e^{(Ct_{gen..normalizador} - Ct_{calibrador.normalizador})}}$$

Cada medición fue realizada en triplicado a partir de tres replicas biológicas. Los datos obtenidos fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism. Se utilizó un test de ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) en los promedios de cada conjunto de datos, seguido de un post-test de Tukey de comparación múltiple, para evaluar si las diferencias entre el promedio de las réplicas era significativo ($p < 0,05$).



7. RESULTADOS

7.1. Obtención de ADN y ARN desde los frutos de *Fragaria chiloensis*

Con el fin de obtener la versión genómica de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* se realizó la extracción de ADN desde el fruto de *Fragaria chiloensis* (Sección 6.2.1.2.). El ADN extraído se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Observándose una banda por encima de la banda de mayor peso molecular (10 kb) en el marcador de peso molecular (PM), indicando esto que el ADN extraído se encuentra integro (Figura 5.A). También se obtuvo ARN desde los estadios de desarrollo de fruto de *F. chiloensis* C1, C2, C3 y C4 (Sección 6.2.1.1). Con el fin de poder sintetizar ADN complementario, aislar y evaluar los niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* que son materia de esta tesis. Los ARN obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel denaturante (Sección 6.2.5), observándose que las subunidades ribosomales de 28S y 18S corresponden a dos bandas bien definidas, pudiendo inferir que el ARN mensajero se encuentra integro (Figura 5.B).

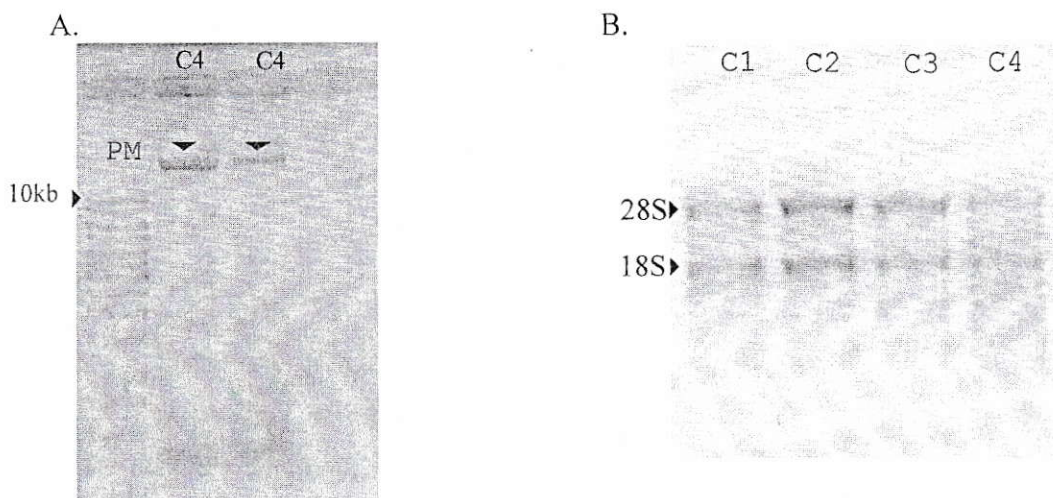


Figura 5: Obtención de ADN y ARN proveniente de frutos de *Fragaria chiloensis*. Se realizó electroforesis a los ácidos nucleicos para verificar la integridad de estos. **A.** El ADN genómico obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se emplearon frutos del estadio C4. Se observa para ambos casos una banda que es mayor que la banda de mayor tamaño en el estándar de peso molecular (10kb). Se indica con las flechas las bandas correspondientes al ADN. **B.** Para el ARN extraído de los estadios C1, C2, C3 y C4 del fruto de *F. chiloensis* se realizó electroforesis en gel denaturante. Se pueden observar las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S (indicadas con flechas) en todos los estadios. PM: Marcador de peso molecular

7.2. Identificación de genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en *Fragaria chiloensis*.

Se aislaron los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* amplificando desde ADN genómico y ADN complementario, sintetizado a partir de ARN extraído desde los frutos de *F. chiloensis* en los estadios C1, C2, C3 y C4 (Sección 7.1).

Los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* se amplificaron haciendo uso de partidores diseñados en *F. vesca* (Sección 6.2.7).

Al amplificar cada gen se observa lo siguiente: *FcLANCL2* presenta una banda única que posee distinto peso molecular al amplificar este gen desde ADN genómico (2500 pb) o complementario (1185 pb), indicando esto la presencia de uno o más intrones a lo largo

de su secuencia genómica (Figura 6.A). Para el gen *FcARP* se observa una banda única al amplificar este gen desde ADN genómico (568 pb) y complementario (261 pb), la diferencia de tamaño entre ambas versiones indicaría también la presencia de uno o más intrones en la versión genómica del gen (Figura 6.B). Para el gen *FcSAUR* se puede ver la amplificación de una única banda desde ADN genómico y complementario que presenta el mismo tamaño (374 pb), lo cual indicaría que el ADN genómico no presenta intrones (Figura 6.C).

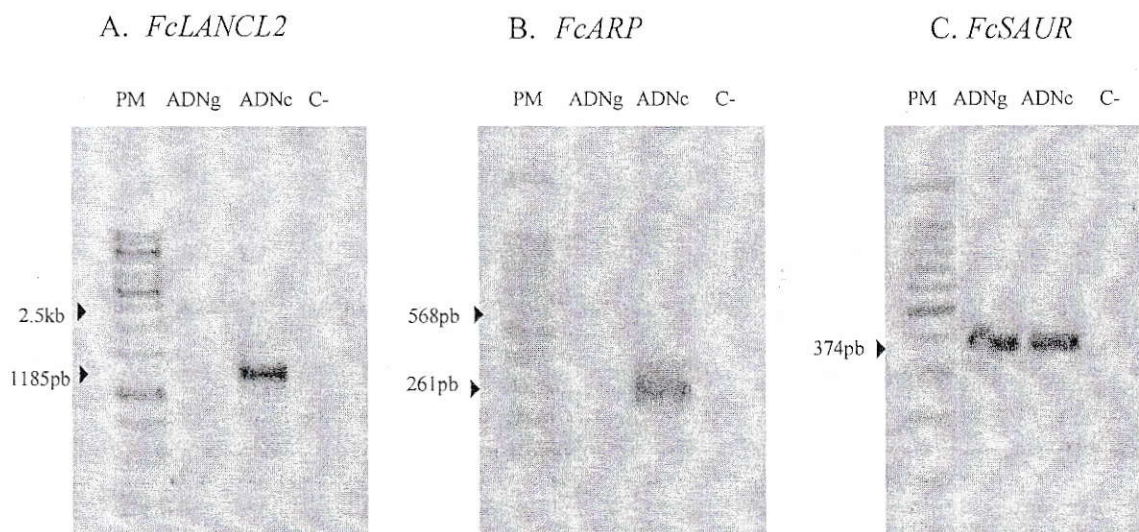


Figura 6: Identificación de la versión genómica y marco de lectura abierto de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*. Se amplificó mediante PCR el largo completo de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* usando como templado ADN genómico (ADNg) y complementario (ADNc) con la enzima HerculaseII. Se realizó electroforesis al producto de PCR y se visualizó en gel de agarosa. **A.** *FcLANCL2* presenta un amplificado usando ADN genómico de 2.500pb y complementario de 1.185pb. **B.** *FcARP* posee una banda en el amplificado desde ADN genómico de 568pb y complementario de 261pb. **C.** *FcSAUR* corresponde a una banda del mismo tamaño desde ADN genómico y complementario de 374 pb. Se indica con flechas las bandas obtenidas para cada gen. PM: Marcador de peso molecular. C-: Control negativo.

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron aislados y purificados desde el gel de

electroforesis (Sección 6.2.4.), y ligados al vector de clonación pCR8/GW/TOPO. La reacción de ligación se utilizó para transformar *E. coli* quimiocompetente con estos vectores (Sección 6.2.2.3.). La cepa de *E. coli* fue crecida en LB sólido en presencia de espectinomicina 100 µg/mL como antibiótico de selección, por 16 horas a 37°C. Se observó la presencia de colonias transformantes en las placas que presentaban los siguientes genes: *FcLANCL2* amplificado desde ADN complementario (Figura 7.A), *FcARP* amplificado desde ADN genómico (Figura 7.B) y complementario (Figura 7.C), y para *FcSAUR* amplificado usando como templado ADN genómico (Figura 7.D) y complementario (Figura 7.E). Para el gen *FcSAUR* se realizaron las transformaciones desde ambos amplificados, para verificar que las secuencias sean iguales y que no presentaran intrones en su secuencia.

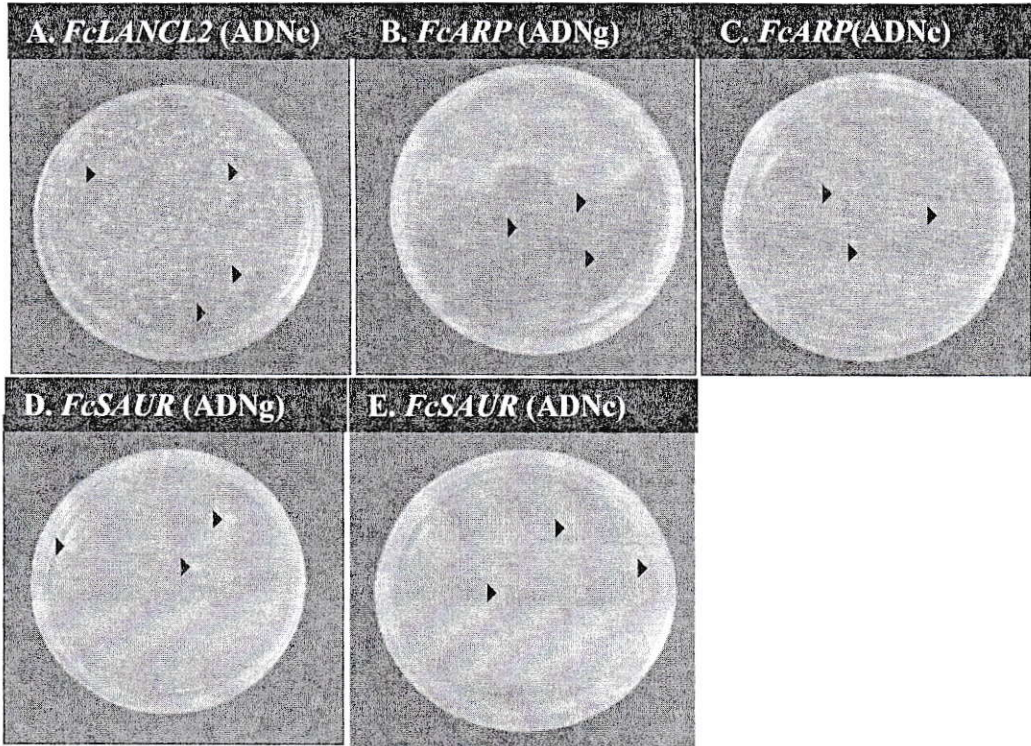


Figura 7: *Escherichia coli* transformante con vectores de clonamiento que portan los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en sus versiones ADN genómico y complementario de *Fragaria chiloensis*. La figura muestra placas con LB sólido más espectinomicina 100 µg/mL, luego de 16 horas a 37°C. Se obtuvieron colonias desde los siguientes genes ligados a PCR8/GW/TOPO: **A.** pCR8-*FcLANCL2* en su versión de ADN complementario. **B.** pCR8-*FcARP* para la secuencia de ADN genómico. **C.** pCR8-*FcARP* para la secuencia de ADN codificante. **D.** pCR8-*FcSAUR* con secuencia de ADN genómico. **E.** pCR8- *FcSAUR* para la secuencia de ADN codificante. Las flechas señalan algunas de las colonias que se analizaron. ADN genómico: ADNg; ADN complementario: ADNc

7.3. Análisis de la presencia y direccionalidad de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en el vector pCR8/TOPO/GW.

Luego de obtener las colonias de *E. coli* transformante se verificó que la clonación haya sido satisfactoria y con el gen en una orientación particular dentro del vector, esto para posteriormente recombinar los genes en vectores de expresión que permitirán expresar una proteína etiquetada mediante la tecnología Gateway.

Para verificar que la clonación haya sido satisfactoria se procedió a verificar la presencia del gen de interés en el vector. Para esto se extrajo el ADN plasmidial (Sección 6.2.1.3.) y se realizó PCR con partidores específicos para el gen siguiendo el protocolo de la sección 6.2.8. Obteniéndose así una banda única del mismo tamaño a la obtenida al amplificar los genes desde ADN complementario en la Sección 7.2. (datos no mostrados). Esto indicó que la clonación de los fragmentos de PCR fue satisfactoria.

Para verificar la direccionalidad del inserto respecto el vector se evaluó el patrón de corte con enzimas de restricción, las cuales se detallan en la tabla 7. En esta tabla además se indica los tamaños esperados de las bandas para considerar que los fragmentos están en la orientación adecuada para su posterior clonamiento en vectores de expresión.

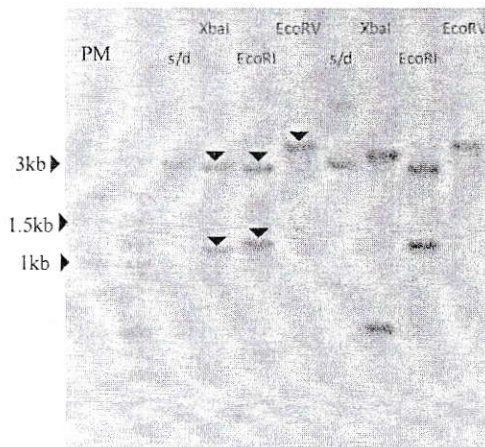
Tabla 7: Enzimas de restricción empleadas para los distintos plasmidios con el gen de interés en pCR8/GW/TOPO y tamaño de los fragmentos esperados para verificar la direccionalidad del inserto en el vector.

CONSTRUCTO (tamaño)	ENZIMAS	Productos esperados de la digestión enzimática (pb)
pCR8-FcLANCL2 (4002pb) ADNc	XbaI	2864, 1138
	EcoRI	2758, 1244
	EcoRV	4002
pCR8-FcARP (3096 pb) ADNc	EcoRI	338, 2758
	EcoRV	289, 2807
pCR8-FcARP (3403 pb) ADNg	Eco RI	645, 2758
pCR8-FcSAUR (3194 pb) ADNc	EcoRI	436, 2758
	AvaI, XbaI	1300, 904, 435, 306, 249
pCR8-FcSAUR (3194 pb) ADNg	EcoRI	436, 2758

Para remover el fragmento insertado completo se empleó la enzima EcoRI, ya que esta enzima corta por fuera del sitio de topoisomerización del plasmidio pCR8/GW/TOPO (Sección 6.2.9). Adicionalmente se usaron las enzimas XbaI para pCR8-FcLANCL2 con

la cual genera dos fragmentos de 1244 pb y 2758 pb y *EcoRV* que corta dentro del inserto de *FcLANCL2*, linearizando el vector generando un fragmento de 4002 pb. De esta manera se confirmó un clon cuyo inserto se encontraba en sentido (Figura 8.A). Para pCR8-FcARPC se usó la enzima *EcoRV* que debe generar dos fragmentos, uno de 289 pb y otro de 2807 pb. Efectivamente se encontró dos clones cuyo inserto se encontraba en sentido (Figura 8.B). En pCR8-FcSAURc se encontró que en tres clones analizados el inserto analizado se encontraba en sentido (Figura 8.D). En este caso se usó *AvaI* y *XbaI* generando fragmentos de 249 pb, 306 pb, 435 pb, 904 pb y 1300 pb, encontrándose que las 3 colonias analizadas se encontraban en sentido (Figura 8.D). Para los genes amplificados desde ADN genómico *FcARP* y *FcSAUR* en el vector de clonación pCR8/GW/TOPO se realizaron digestiones enzimáticas con *EcoRI* y la digestión liberó por completo el fragmento insertado, de tamaño muy similar al obtenido por PCR en la sección 7.2. (Figura 8 C y E).

A *FcLANCL2* (ADNc)



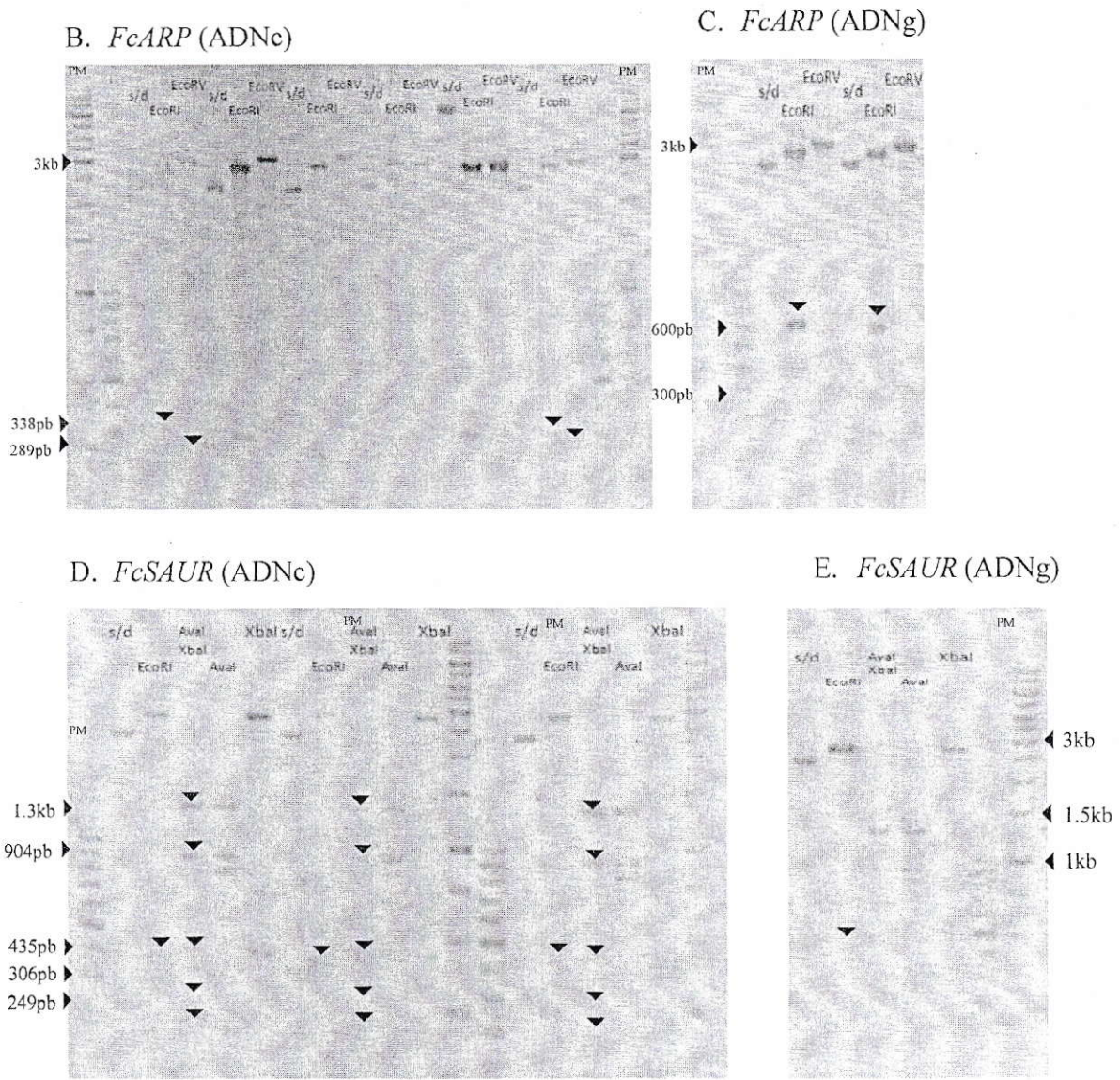


Figura 8: Análisis de la direccionalidad de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en el vector pCR8/GW/TOPO. Para evaluar la direccionalidad del gen insertado se realizaron ensayos con enzimas de restricción y luego fueron sometidos a electroforesis de agarosa 1.5%. En la imagen se resaltan los clones cuyos insertos se encuentren en sentido esperado en el vector. **A.** pCR8-*FcLANCL2* digerido con las enzimas *XbaI*, *EcoRI* y *EcoRV*. **B.** pCR8-*FcARP* digerido con la enzima *EcoRV*. **D.** pCR8-*SAUR* digerido en doble digestión con las enzimas *AvaI* y *XbaI*. **C** y **E.** También se realizaron digestiones enzimáticas a los insertos en pCR8 provenientes de ADN genómico de *FcARP* y *FcSAUR*, obteniéndose el tamaño bandas de esperado para el caso de la digestión con *EcoRI*. PM: Marcador de peso molecular. s/d: plasmidio sin digerir. ADN genómico ADNg; ADN complementario: ADNc

Los plasmidios que presentaban el gen en el sentido esperado en el vector de clonación pCR8/GW/TOPO se enviaron a secuenciar haciendo uso de partidores M13 que se encuentran en la secuencia del vector y flanquean el inserto, y así poder conocer la secuencia nucleotídica de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*, y compararlas con las secuencias en *F. vesca*, en la base de datos www.strawberrygenome.org, desde la cual fue que se diseñaron los partidores. Se enviaron a secuenciar los clones que se encontraban en sentido (indicados con flechas en la Figura 8), tomando de uno a tres clones para cada gen, en las versiones de ADN genómico y complementario.

7.4. Análisis bioinformático de los genes en estudio

Luego de secuenciar los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* insertos en pCR8/GW/TOPO usando los partidores universales M13, se procedió a analizar las secuencias obtenidas. Para esto primero se buscaron los partidores específicos para cada gen dentro de la secuencia, y se depuró la secuencia del gen de interés de las pertenecientes al vector pCR8/GW/TOPO. Con las secuencias depuradas, se procedió a realizar BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se encontró que la secuencia más similar era de *F. vesca*. Luego se compararon ambas secuencias y se halló las similitudes que poseían ambas. Se buscaron los dominios conservados de las proteínas que codificaban los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*. Se compararon las secuencias aminoacídicas con las de otras especies y se generó un árbol filogenético. También se compararon las secuencias provenientes desde ADN genómico y ADN complementario para realizar la distribución exón-intrón de cada gen.

Se encontró que el gen *FcLANCL2* posee gran similitud con el gen *LANCL2* de *F. vesca*,

con quien comparte un 91% de identidad aminoacídica (Figura 9.A). Este gen codifica para una proteína de 395 aminoácidos, de los cuales 330 aminoácidos de la secuencia pertenece a la familia de los LANCL2 (<http://prosite.expasy.org/>). El producto génico del gen *FcLANCL2* presenta 7 dominios transmembrana característicos de las proteínas LANCL2, dos sitios para la unión de zinc y tres sitios activos para la correcta deprotonación de la molécula de afinidad (posiblemente ABA) y su correcta ciclación (Figura 10.A). *FcLANCL2* presenta 43% de identidad aminoacídica con LANCL2 presente en humanos, teniendo los dominios transmembrana y sitios conservados mencionados. Así mismo, *FcLANCL2* posee 61% de identidad aminoacídica con un receptor acoplado a la proteína G de *A. thaliana*, que podría unir ABA y desencadenar una respuesta a esta hormona. Sin embargo esto no ha sido demostrado para la proteína de *A. thaliana*. Al realizar un árbol filogenético para agrupar las secuencias mas similares, se obtiene que *FcLANCL2* se agrupa en el mismo clado que LANCL2 de *F. vesca* (Figura 9.B).

FcARP posee gran similitud aminoacídica con ARP de *F. x ananassa* (90%), con *F. vesca* (88%) y con *A. thaliana* (64%) (Figura 9.C). Este gen codifica para una proteína de 86 aminoácidos de los cuales 52 aminoácidos conforman un dominio presente en la familia de los genes reprimidos por auxina y asociados a dormancia (Figura 10.B). *FcARP* se observa en el mismo clado que sus parientes *F. x ananassa* y *F. vesca*, y cerca a *M. domestica* que también pertenece a la familia de las Rosaceae. Al comparar la secuencia de ADN genómica y ADN complementario se puede obtener la distribución exón-intrón, encontrándose así que el gen *FcARP* presenta 4 exones y 3 intrones a lo largo de su secuencia (Figura 11.A)

Se encontró que el gen *FcSAUR* posee gran similitud con el gen SAUR de *F. vesca*, con quien comparte un 98% de similitud aminoacídica y en *A. thaliana* al gen SAUR con quien comparte mayor similitud es *AthSAUR78* (57%) (Figura 9.D). *FcSAUR* codifica para una proteína de 124 aminoácidos, de los cuales una región de 90 aminoácidos pertenece al dominio conservado inducible por auxina (Figura 10.C). *FcSAUR* se encuentra en el mismo clado que una proteína inducible por auxina en *F. vesca* (Figura 9.F) y posee el 98% de identidad aminoacídica con esta secuencia. La secuencia de *FcSAUR* no presenta intrones ya que las secuencias obtenidas desde ADN genómico y complementario son exactamente iguales (Figura 11.B).

FcLANCL2

A.

Especie	% de Identidad aminoacídica con <i>F. chiloensis</i>
<i>F. vesca</i>	91%
<i>A.thaliana</i>	61%

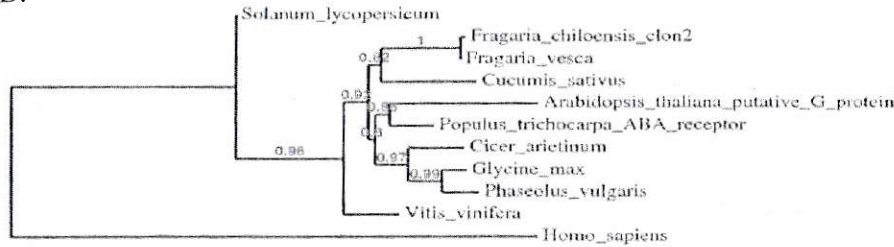
C. *FcARP*

Especie	% de Identidad aminoacídica con <i>F. chiloensis</i>
<i>F.x ananassa</i>	90%
<i>F.vesca</i>	88%
<i>A.thaliana</i>	64%

F. *FcSAUR*

Especie	% de Identidad aminoacídica con <i>F. chiloensis</i>
<i>F. vesca</i>	98%
<i>A.thaliana</i>	57%

B.



D.

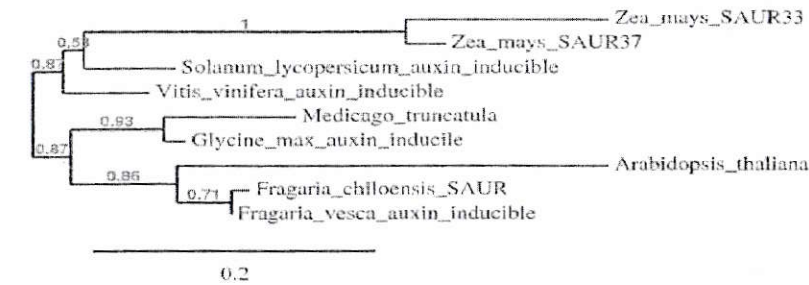
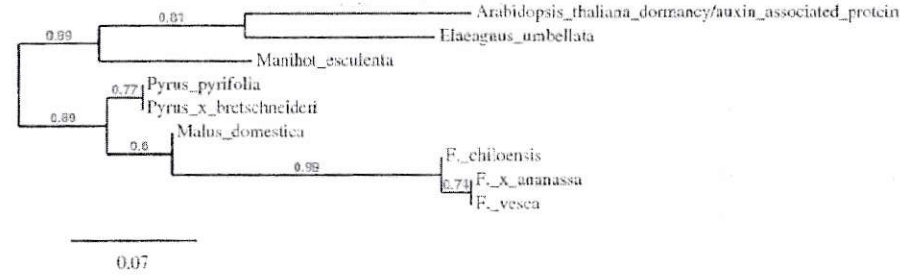


Figura 9: Similitud de las secuencias *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* con otras especies. Se analizó bioinformáticamente las distintas secuencias obtenidas. **A, C y E** Porcentaje de identidad aminoacídica de los productos génicos con *F. vesca*, *F. x ananassa* y *A. thaliana*. **B, D y F.** Árbol filogenético con las secuencias aminoacídicas de los productos génicos de *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*, y las secuencias aminoacídicas depositadas en el

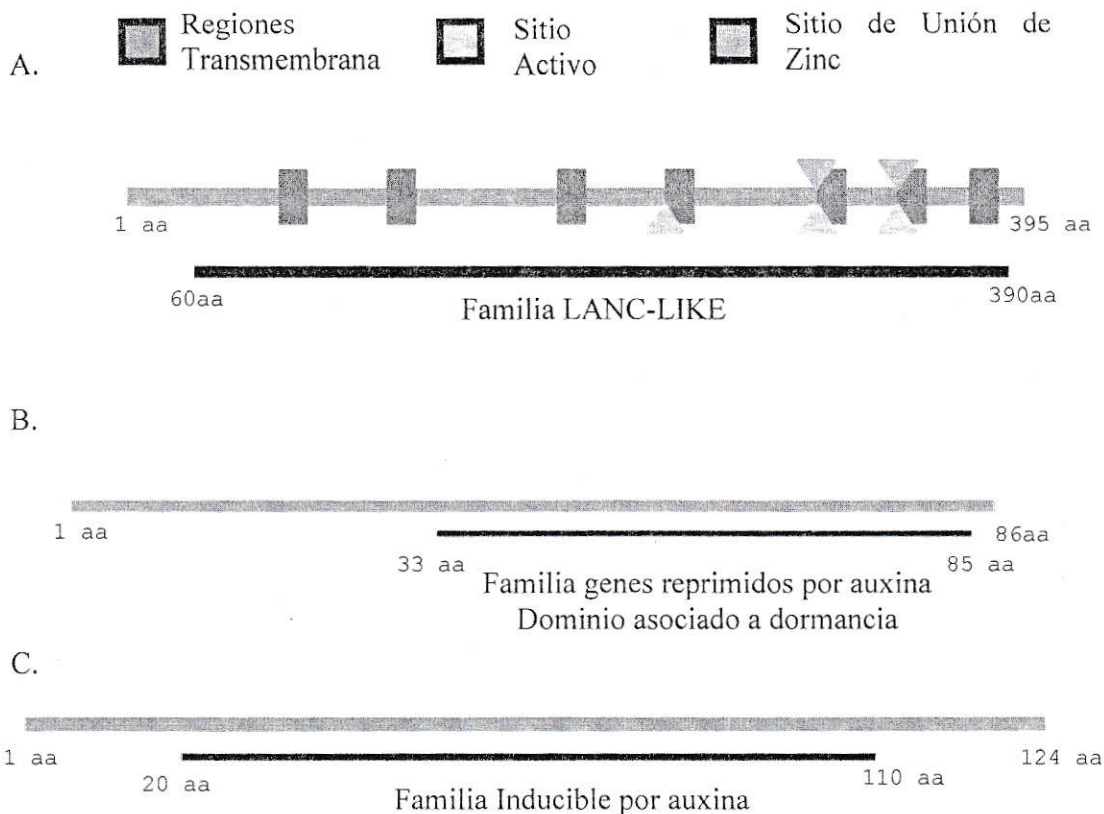


Figura 10: Representación gráfica del producto génico de *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR*. Las secuencias fueron analizadas en la base de datos Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) del que se obtuvo los dominios característicos para cada proteína. **A.** *FcLANCL2* de 385aa de largo presenta 7 dominios transmembrana (morado), sitios activos característicos de esta familia de proteínas (amarillo) y sitios de unión a zinc (naranja) y una región conservada de 330aa de largo para la familia de los LANCL. **B.** *FcARP* de 86aa de largo presenta un dominio conservado de 52aa perteneciente a la familia de los genes reprimidos por auxina. **C.** *FcSAUR* de 124 aa de largo presenta un dominio conservado de 90aa para la familia de genes inducibles por auxina.

A. *FcARP*



B. *FcSAUR*



Figura 11. Distribución exón-intrón de los genes *FcARP* y *FcSAUR*. Se compararon las secuencias de ADN genómico y complementario de los genes *FcARP* y *FcSAUR*. **A.** *FcARP* presenta 4 exones “E” y 3 intrones “I” a lo largo de su secuencia. **B.** *FcSAUR* no presenta intrones a lo largo de su secuencia ya que el ADN genómico y complementario son del mismo tamaño.

7.5. Niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis* de la temporada

2014

Con el ADN complementario sintetizado a partir de los estadios C1, C2 C3 y C4 del fruto de *F. chiloensis* se realizaron ensayos de qRT-PCR para evaluar así los niveles de transcrito de los genes en las distintas etapas del desarrollo de éste (Sección 6.2.14.).

Se pudo observar que los niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* varían a lo largo del desarrollo del fruto de *F. chiloensis*. El hecho que estos genes se expresen diferencialmente confirma el haberlos encontrado en las SSH (Pimentel y col., 2011).

Es así que el gen *FcLANCL2* aumenta sus niveles de transcrito en el estadio C2 con respecto al C1 (Figura 12.A). El mayor nivel de transcrito, cercano a 3 veces con respecto al estadio de C1, se obtiene en el estadio de C3 y luego este disminuye en C4, el que sin embargo es mayor que C1 (Figura 12.A).

Para *FcARP* presenta niveles de transcrito similares en el estadio de C1 y C2, y en el estadio de C3 disminuye 3 veces con respecto al estadio C1 y C2, para luego disminuir 6 veces con respecto al estadio de C3 (Figura 12.B). Este comportamiento del gen *FcARP* en el fruto podría correlacionarse con el patrón de acumulación de auxina en frutos del género *Fragaria* (Symons y col., 2012).

El gen *FcSAUR* aumenta sus niveles de transcrito conforme el fruto va desarrollándose, presentando en el estadio C2, 5 veces más niveles de transcrito que en el estadio de C1, en el estadio de C3, 10 veces más que en el estadio de C2 y los mayores niveles de transcrito en el estadio C4, presentado en este estadio 100 veces más niveles de transcrito que en el estadio C1 (Figura 12.C).

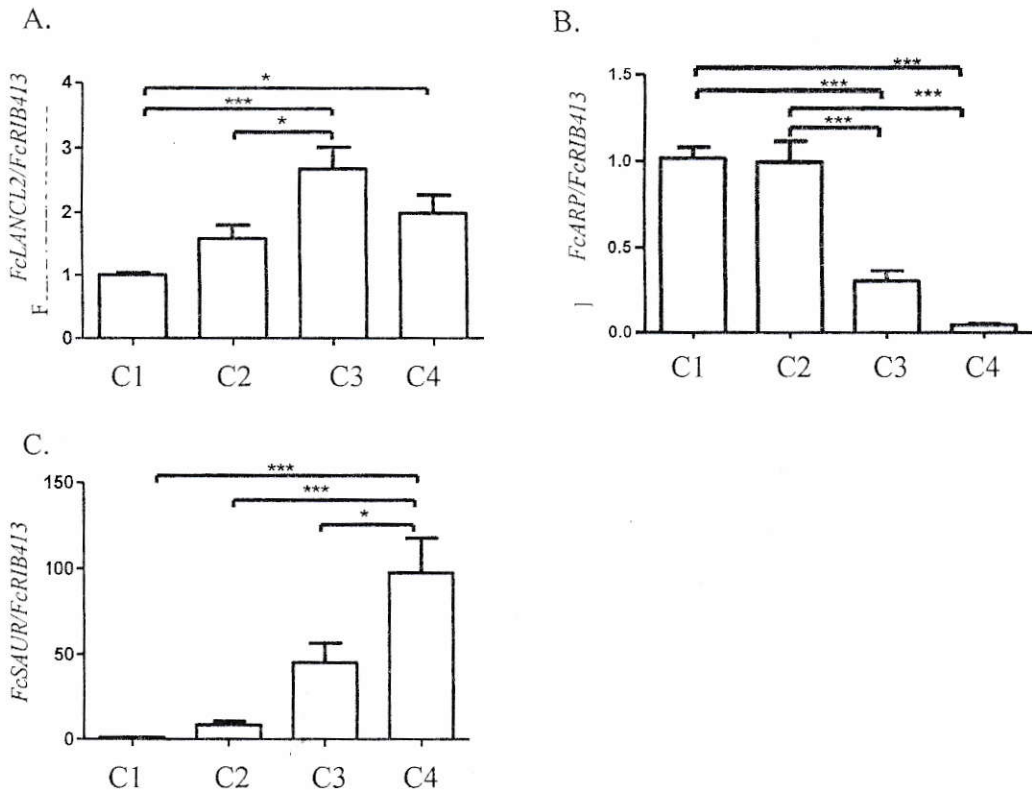


Figura 12: Niveles de expresión de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*. Análisis de los niveles de transcrito en los estadios C1, C2, C3 y C4 del fruto de *F. chiloensis* por qRT-PCR de los genes *FcLANCL2* (A), *FcARP* (B) y *FcSAUR* (C). Se utilizaron frutos colectados en la temporada 2014. Se usó *FcRIB413* como gen normalizador. Los resultados se expresan en niveles de transcrito relativos al estadio C1. Se realizaron 3 réplicas biológicas, con sus respectivas tres réplicas técnicas. Análisis estadístico ANOVA y post test de Tukey ($p < 0.05$).

7.6. Niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis* en dos temporadas de cosecha: 2012 y 2013.

F. chiloensis genera frutos de manera anual, los cuales son cosechados en el sur de Chile en el mes de diciembre. Para evaluar si la expresión diferencial de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* es reproducible en diferentes temporadas de crecimiento de fruto, se analizaron los niveles de transcrito de estos genes en dos temporadas anteriores; 2012 y 2013. En este análisis se observó que los genes *FcLANCL2* y *FcSAUR* mostraban algunas variaciones en los cambios de niveles de transcrito a través del desarrollo del fruto. Sin embargo *FcARP* presenta la misma tendencia en sus niveles de transcrito en los estadios de desarrollo del fruto en las tres temporadas analizadas 2012, 2013 y 2014.

Es así que *FcLANCL2* presenta mayores niveles de expresión en los estadios de C2 y C3 en ambas temporadas (Figura 13 A y B). Sin embargo las veces de cambio con respecto al estadio de C1 en cada temporada son distintas, pudiendo observarse que en la temporada del 2012, el estadio C2 varía 4 veces con respecto a C1. En la temporada 2013, el estadio C2 varía 1.5 veces con respecto a C1. Para el estadio C3 se observa que *FcLANCL2* presenta los mismos niveles de expresión que en el estadio C2, a cada temporada respectiva. Los niveles de transcrito decaen del estadio C3 al C4, llegando estos a ser similares a los del estadio C1, en ambas temporadas (Figura 13.A y B).

FcARP presenta niveles de transcrito muy similares en ambas temporadas. Observándose así que en el estadio de C1 y C2 los niveles de transcrito son muy cercanos a uno, y en el estadio C3 disminuyen tanto para la temporada 2012 como para la temporada 2013. En el

estadio de C4 disminuye 10 veces con respecto al estadio C3 (Figura 13 C y D).

El gen *FcSAUR* varía sus niveles de transcrito entre la temporada del 2012 y 2013. Presentando en estadio de C2 un aumento en los niveles de transcrito de 5 veces en la temporada 2012 y 10 veces en la temporada 2013, con respecto al estadio C1 (Figura 13 E y F). En el estadio C3 se observa un aumento de 20 veces en la temporada 2012 y casi 100 veces en la temporada 2013 con respecto al estadio C1 (Figura 13 E y F). Sin embargo en el estadio C4, sus niveles decaen a mitad con respecto al estadio C3 en la temporada 2012. En la temporada 2013, el gen *FcSAUR*, aumenta sus niveles de expresión hacia 120 veces con respecto al estadio C1 veces presenta para la temporada 2012 (Figura 13 E y F).

TEMPORADA 2012

TEMPORADA 2013

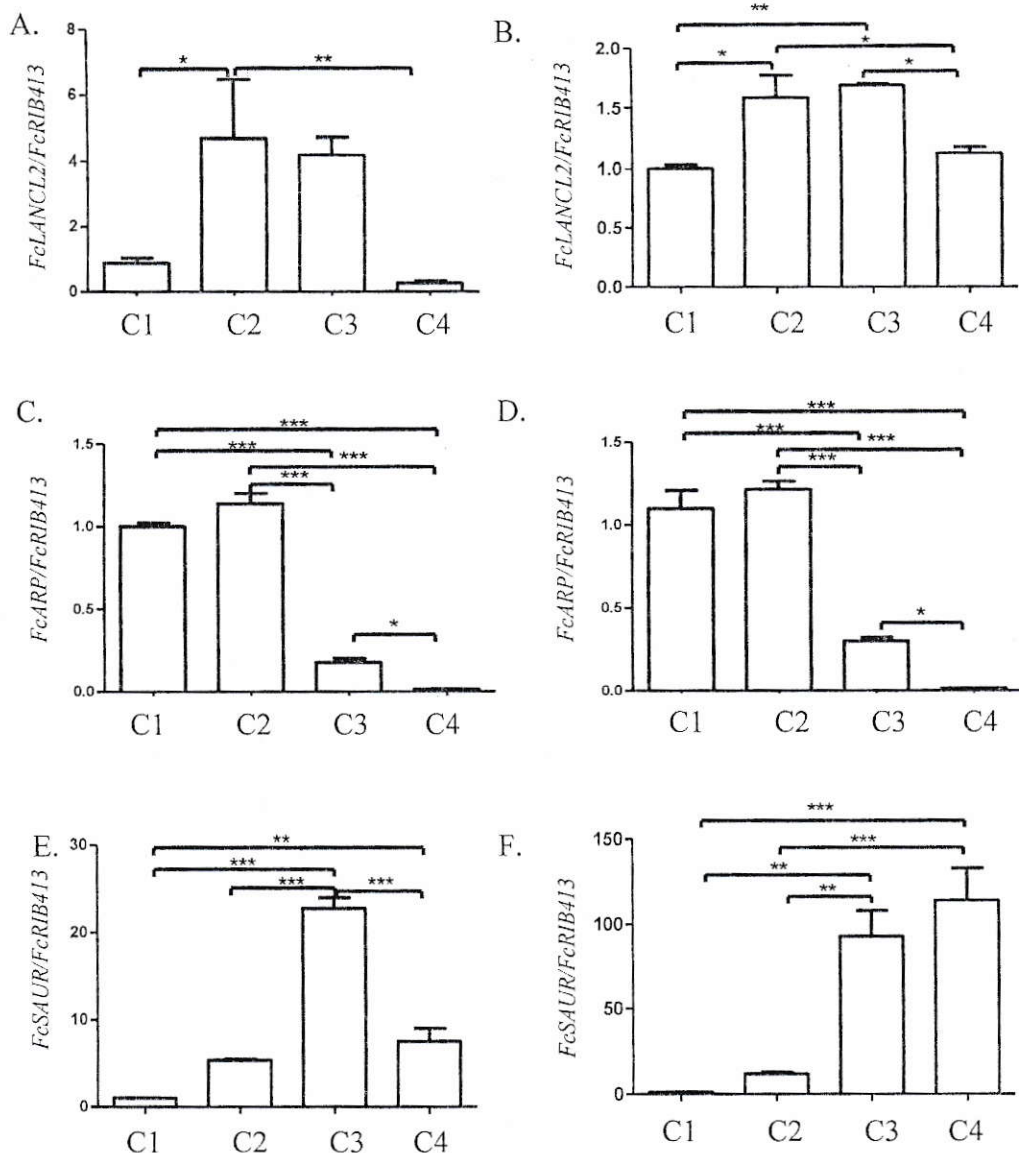


Figura 13: Comparación de los niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis* colectados en las temporadas 2012 y 2013. Análisis de los niveles de transcrito en los estadios C1, C2 C3 y C4 del fruto de *F. chiloensis* por qRT-PCR de los genes *FcLANCL2* (A y B), *FcARP* (C y D) y *FcSAUR* (E y F). Se usó *FcRIB413* como gen normalizador. Frutos colectados en temporada 2012 (A, C y E) y 2013 (B, D y F). Se realizó una réplica biológica con triplicados técnicos. Análisis estadístico ANOVA y post test de Tukey ($p < 0.05$)

7.7. Síntesis de ADN complementario desde ARN de frutos *Fragaria chiloensis* tratados con ABA y NAA

Los tratamientos fueron realizados en el estadio C2 porque es un estadio en el cual el fruto se encuentra inmaduro, y teóricamente los niveles de ABA se encuentran bajos comparados con los niveles del último estadio del desarrollo del fruto (C4) (Figura 2), y al agregarle ABA se espera, según nuestra hipótesis que el gen *FcLANCL2* se induzca con esta hormona. También se realizaron tratamientos con NAA en el mismo estadio de desarrollo del fruto, esto ya que estas dos hormonas están íntimamente relacionadas en la maduración del fruto, y al realizar los tratamientos en el mismo estadio se espera poder comparar los resultados obtenidos para *FcLANCL2*, según el estadio analizado.

Los frutos del estadio C2 colectados en la temporada 2014 se sometieron a tratamientos hormonales con ABA 1 mM y NAA 1 mM (Sección 6.2.13). Se extrajo ARN de estos frutos (Sección 6.2.1.1.) y se verificó la integridad de éstos (Sección 6.2.5.) (Figura 14.A). Observada la integridad de ARN se procedió a tratarlo con DNAsas para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico que pudiera interferir posteriormente. Para verificar que se haya eliminado el ADN se amplificó el gen *FcANS* mediante PCR, usando el ARN libre de DNAsas como templado. Al no observar amplificación se puede concluir que el tratamiento fue efectivo (Figura 14.B). Con el ARN libre de ADN, se sintetizó ADN complementario (Sección 6.2.6.) y se verificó su integridad y calidad amplificando el gen *FcANS* (Sección 6.2.8.). En este caso se observó una banda única y definida de 1174 pb para el ADN complementario (Figura 14.C.). La distinta intensidad de las bandas (Figura 14.C) puede explicarse debido a los diferentes niveles de transcrito que presentan para este gen en tratamientos con ABA y NAA, los cuales se han reportado que se inducen en

tratamientos con ABA (Chai y col., 2011).

Al observar la integridad del ADN complementario se procedió a analizar los niveles de expresión de los genes *FcLANCL2*, *FcNCED*, *FcARF2* y *FcGAPDH2*.

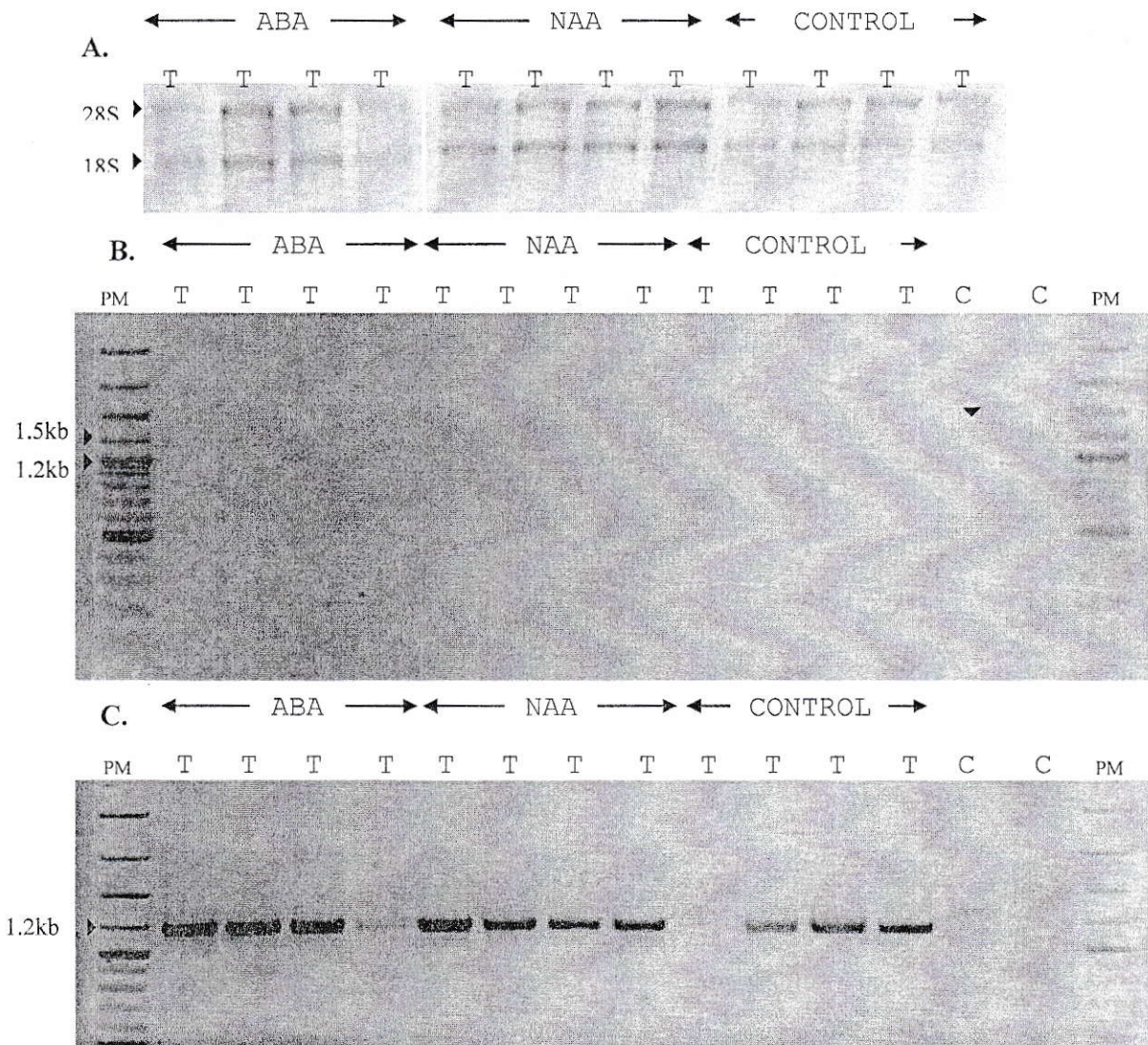


Figura 14: Obtención de ADN complementario desde ARN de frutos de *Fragaria chiloensis* en el estadio C2 tratados con ABA y NAA. **A.** ARN extraído de los frutos en estadio C2 sometidos a tratamientos hormonales, y su respectiva condición control, sometido a electroforesis en gel denaturante a 70V por 40 min. Se observan las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S, señalado con flechas. **B.** Electroforesis del producto de PCR de

FcANS usando ARN tratado con DNAsa. El control positivo usado (C+) es ADN genómico de *F. chiloensis*. C. Verificación de la integridad y calidad del ADN complementario mediante la amplificación de *FcANS* (1174 pb). El control positivo usado (C+) es ADN genómico de *F. chiloensis* y para el control negativo (C-) se empleó agua como templado. T0: Tiempo cero luego del tratamiento hormonal. T1: 30 min luego del tratamiento hormonal. T2: 1 hora luego del tratamiento hormonal. T3: 12 horas luego del tratamiento hormonal. PM: Marcador de peso molecular.

7.8. Efecto de ABA en los niveles de transcrito de *FcLANCL2* en el estadio C2 del fruto de *Fragaria chiloensis*

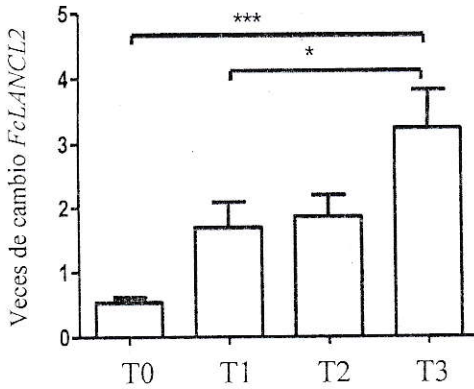
Para evaluar si el gen *FcLANCL2* responde a ABA se realizaron tratamientos hormonales con 1 mM de ABA (Sección 6.2.13). Se analizó los niveles de transcrito de este gen, luego de distintos periodos de tiempo del tratamiento con 1 mM de ABA y en condición control. Los resultados se expresaron como las veces de cambio del tratamiento con ABA respecto a la condición control respectiva.

Se obtuvo que los niveles de transcrito del gen *FcLANCL2* aumentaron 2 veces luego de 30 minutos (T1) y 1 hora (T2) de terminado el tratamiento con ABA. La mayor inducción se obtuvo a las 12 horas después del tratamiento con ABA (T3), presentando 4 veces de cambio respecto al control de su mismo tiempo, e induciéndose más de 6 veces con respecto a las veces de cambio del tiempo inicial (T0) (Figura 15.A).

Para verificar que el tratamiento realizado con ABA efectivamente causa cambios a nivel genómico, se analizó cómo respondía un gen reportado en la literatura que se induce por ABA en *F. x ananassa*. NCED es un gen cuyo producto génico está involucrado en la biosíntesis de ABA en *F. x ananassa* (Jia y col., 2011) la cual deriva de *Fragaria chiloensis*. Se observa que este gen responde tempranamente al tratamiento con ABA, induciéndose 6 veces luego de 30 minutos (T1) respecto al tiempo inicial luego de

terminado el tratamiento (T0), siendo esta diferencia en el tiempo T1 estadísticamente significativa con respecto a los demás tiempos del tratamiento (Figura 15.B). Luego de 1 hora y 12 horas de terminado el tratamiento, T2 y T3 respectivamente, las veces de cambio del gen *FcNCED* son similares a las de tiempo T0, y las veces de cambio de este gen respecto a su control es 1, es decir no hay diferencias entre la condición tratamiento y la condición control (Figura 15.B). Esto confirmaría la efectividad del tratamiento hormonal con ABA en los frutos de *F. chiloensis*.

A.



B.

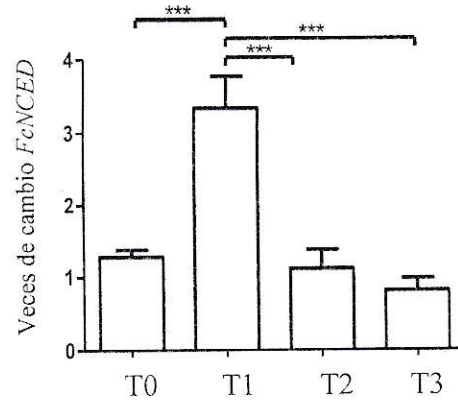


Figura 15: Efecto de ABA en los niveles de transcrito de *FcLANCL2* en el estadio C2 del fruto de *Fragaria chiloensis*. Análisis de los niveles de transcrito por qRT-PCR luego de un pulso de 1 mM de ABA de frutos de estadio C2 de la temporada 2014. T0: 0 minutos luego del pulso hormonal de 10 minutos. T1: 30 minutos luego del pulso hormonal, T2: 1 hora luego de pulso hormonal T3: 12 horas luego del pulso hormonal. Los niveles de transcrito de cada tratamiento fueron normalizados con su respectiva condición control (iguales condiciones de tratamiento sin ABA). Se evaluó los niveles de transcrito de *FcLANCL2* (A), y del gen *FcNCED* que fue usado para evaluar la efectividad del tratamiento con ABA (B). Se realizaron tres réplicas biológicas con sus respectivas tres réplicas técnicas para cada biológica, en cada experimento. *FcGAPDH2* fue usado como gen normalizador. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post test de Tukey ($p < 0.05$)

7.9. Efecto de NAA en los niveles de transcrito de *FcLANCL2* en el estadio C2 del fruto de *Fragaria chiloensis*.

La hormona auxina es importante en el desarrollo de frutos no climatéricos como *F. chiloensis*, específicamente en los estadios más tempranos ya que propicia la división celular, entre otras funciones (Cherian y col., 2014). No se han reportado estudios respecto a que los genes de la familia de los LANCL2 sean regulados por auxina. Este gen comparte homología con un receptor acoplado a la proteína G de *A. thaliana* (61%) y se ha reportado que las proteínas G modulan el transporte de auxina (Urano y col., 2013), por lo cual el gen *FcLANCL2* podría presentar respuesta a auxina.

Por ello se evaluó la respuesta del gen *FcLANCL2* frente a tratamientos con auxina exógena. Para ello se utilizó la auxina ácido 1-naftalenacético (NAA). Se realizaron tratamientos en el fruto de estadio C2, esto para poder comparar los resultados de respuesta del gen *FcLANCL2* en el mismo estadio, tanto para ABA como para NAA.

Para esto se analizó los niveles de transcrito del gen *FcLANCL2* en el fruto de *F. chiloensis* tras ser sometido a un pulso con 1 mM NAA (Sección 6.2.13.) por 10 minutos (T0) y se evaluó a tiempos posteriores de 30 minutos luego de pulso hormonal (T1), luego de 1 hora del pulso hormonal (T2) y después de 12 horas del pulso hormonal (T3). Se usó como gen normalizador *FcGAPDH2*. Se referenciaron los datos al tiempo T0 del pulso con NAA y se graficaron las veces de cambio del gen en el tratamiento respecto del control (Figura 16).

Al analizar los resultados en la Figura 16.A se observa que *FcLANCL2* presenta una inducción estadísticamente significativa de 8 veces luego de 30 minutos del pulso hormonal con NAA. Esto significa que el gen es sensible a los cambios inducidos por el

tratamiento. Sin embargo a tiempo posteriores los niveles de transcrito disminuyen alcanzando niveles que no presentan diferencias significativas al tiempo T0 (Figura 16.A). Para verificar que el tratamiento con NAA exógeno fuese efectivo se analizó un gen que responda a NAA en *Solanum lycopersicum* (Zouine y col., 2013). Los niveles de acumulación de esta hormona en el fruto de *S. lycopersicum* son similares a los de *Fragaria x ananassa*. Se evaluó los niveles de transcrito del gen *FcARF2* en tratamientos con NAA evaluando las veces de cambio respecto al tratamiento control. Este gen se indujo luego del pulso con NAA (T0), mostrando una inducción de 3.5 veces con respecto al tratamiento control del mismo tiempo (Figura 16.B). Esta inducción cae aproximadamente un 50% luego de una hora (T2) del tratamiento y aún mas luego de 12 horas del pulso hormonal (T3) (Figura 16.B).

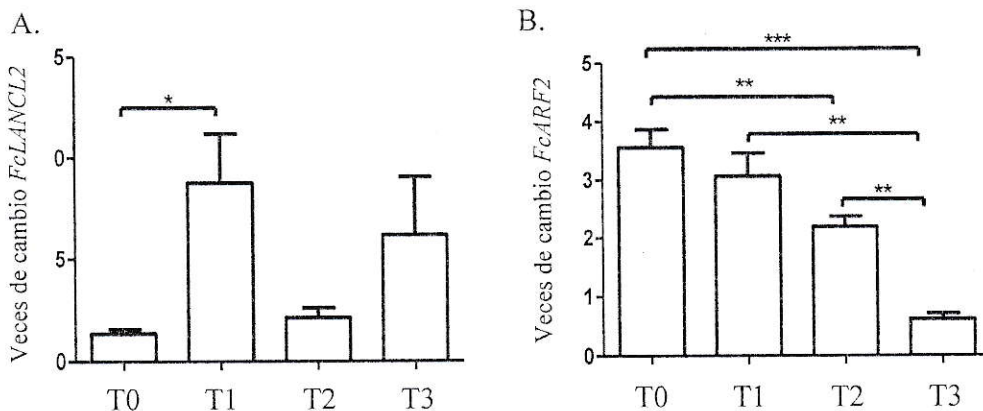


Figura 16: Efecto de la auxina NAA en los niveles de transcrito de *FcLANCL2* en el estadio C2 del fruto de *Fragaria chiloensis*. Análisis de los niveles de transcrito por qRT-PCR luego del pulso hormonal con NAA de frutos del estadio C2 de la temporada 2014. T0: 0 minutos luego del pulso hormonal de 10 minutos. T1: 30 minutos luego del pulso hormonal, T2: 1 hora luego de pulso hormonal T3: 12 horas luego del pulso hormonal. Cada tratamiento fue normalizado con su respectivo control, observándose así las veces de cambio para los genes *FcLANCL2* (A) y el gen *FcARF2* (B), descrito como un gen que responde a auxina. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada réplica biológica en cada experimento. *FcGAPDH2* fue usado como gen

normalizador para los tratamientos hormonales. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post test de Tukey ($p < 0.05$).

7.10 Niveles de transcrito de los genes *FcNCED* y *FcARF2* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*

Debido a que los genes *FcNCED* y *FcARF2* responden a los tratamientos con hormonas exógenas en el fruto de *F. chiloensis* similar a lo descrito en otros modelos (Figura 15 y 16), se evaluó los niveles de transcrito de estos genes en los distintos estadios de desarrollo de fruto como referencia de los niveles de ABA y auxina en los frutos. Si bien no se puede establecer una relación directa entre la expresión de estos genes y el nivel de hormonas, podría existir una correlación positiva entre los niveles de acumulación de transcrito de estos genes con la hormona correspondiente.

Es así que para el gen *FcNCED* los niveles de transcrito aumentan 30 veces del estadio C1 al C2, y estos vuelven a aumentar hacia el estadio C3 aproximadamente 100 veces, respecto al estadio C1. Los mayores niveles de transcrito de este gen se presentan en el estadio C4, que se observan 300 veces más niveles de transcrito con respecto a C1 (Figura 17.A). Este aumento concuerda con el patrón de acumulación de ABA en frutos del género *Fragaria* (Symons y col., 2012).

FcARF2 muestra niveles de expresión muy similares entre los estadio C1, C2 y C3, sin embargo hacia el estadio de C4 se ve que los niveles de transcrito disminuyen 3 veces con respecto a los demás estadios (Figura 17.B). Esta disminución hacia el estadio C4 concordaría con el patrón hormonal de auxina en el desarrollo de frutos del género *Fragaria* (Symons y col., 2012)



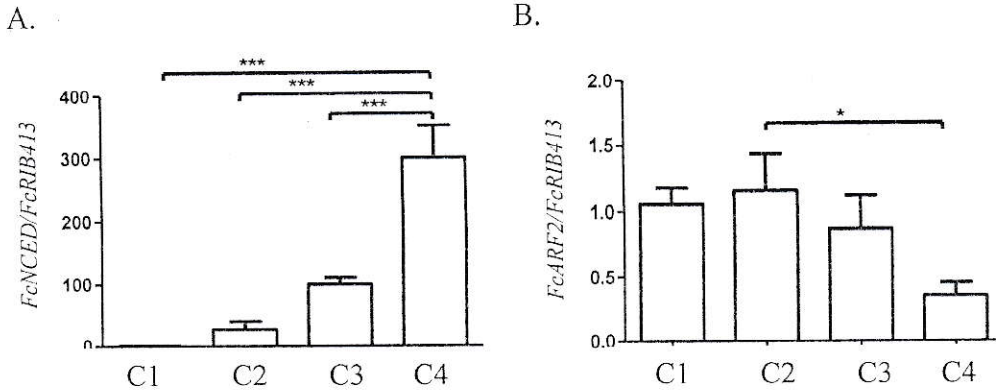


Figura 17: Niveles de expresión de los genes *FcNCED* y *FcARF2* en los distintos estadios de desarrollo del fruto de *Fragaria chiloensis*. Análisis de los niveles de transcrito en los estadios C1, C2, C3 y C4 del fruto de *F. chiloensis* por qRT-PCR de los genes *FcNCED* (A) y *FcARF2* (B). Se utilizaron frutos colectados en la temporada 2014. Se usó *FcRIB413* como gen normalizador. Los resultados se expresan en niveles de transcrito relativos al estadio C1. Se realizaron 3 replicas biológicas, con sus respectivas tres réplicas técnicas. Análisis estadístico ANOVA y post test de Tukey ($p < 0.05$).

7.11. Expresión del gen *FcLANCL2* en *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia del marco de lectura abierto del gen *FcLANCL2* obtenida en la sección 7.3 fue amplificada sin el codón de término con el fin de recombinar esta secuencia en un vector de expresión de proteínas en levaduras. Por ello, se diseñaron partidores para amplificar el gen, reemplazando el codón de término TAA por GGA, que codifica para el aminoácido glicina y de esta manera permitir expresar la versión de la proteína con una proteína de fusión de fusión. Se eligió el aminoácido glicina para evitar alteraciones en la conformación final de la proteína de fusión C-terminal. Esta secuencia *FcLANCL2* contenida en pCR8/GW/TOPO, pCR8-*FcLANCL2*-NST (Sección 6.1.2) se recombinó en el vector de expresión del proteínas en levaduras pAG426-GPD-ccdB-EGFP, y se transformó *E. coli* quimiocompetentes. Para verificar la correcta recombinación se realizó

ensayos con enzimas de digestión (Tabla 8), y se pudo observar el tamaño de bandas esperado para pAG426-GPD-ccdB-EGFP (Figura 18. A) y para pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP (Figura 18. B).

Tabla 8: Enzimas de restricción empleadas para analizar los distintos plasmidios con el gen FcLAN-LIKE2 en el vector pAG426-GPD-ccdB-EGFP y tamaño de los fragmentos esperados para verificar la direccionalidad del inserto.

CONSTRUCTO	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS (pb)
pAG426-GPD-ccdB-EGFP	EcoRI	6877, 1274
	NcoI	4796, 3352
pAG426-GPD-FcLANCL2 -EGFP.	XhoI	9031
	SspI	992, 1177, 1670, 2362 y 2630
	XhoI+SspI	730, 940, 992, 1177, 2362 y 2630

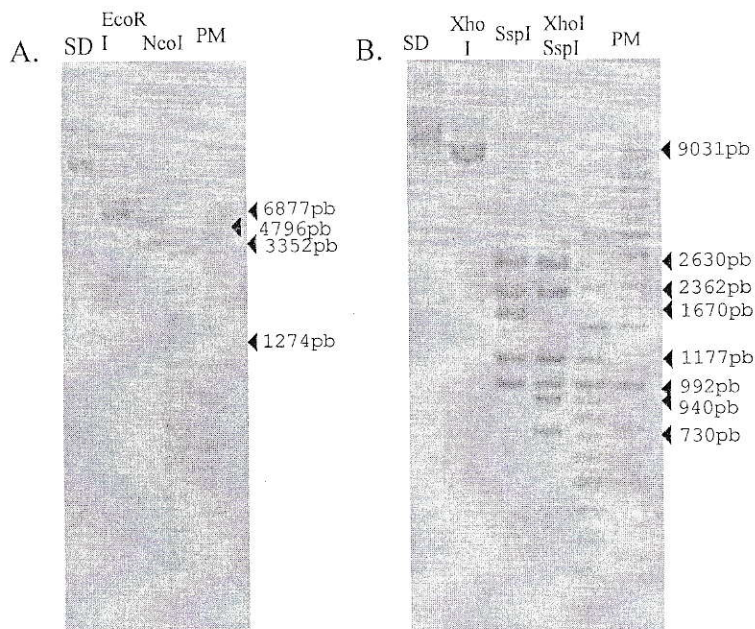


Figura 18: Corroboración de las construcciones pAG426-GPD-ccdB-EGFP y pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP mediante digestión enzimática. Se realizó restricción enzimática para verificar que se haya dado correctamente la recombinación y el gen *FcLANCL2* se encuentre en sentido con el promotor GPD. **A.** Para pAG426-GPD-ccdB-EGFP, se emplearon las enzimas EcoRI cuyo patrón de corte debe originar bandas de 6877pb y 1274pb y con NcoI bandas 4796 pb y 3352 pb. **B.** Para pAG426-GPD-LcLANCL2-EGFP, se realizaron digestiones enzimáticas cuyo patrón de corte debe originar bandas con XhoI de 9031 pb, con SspI de 992 pb, 1177 pb, 1670 pb, 2362 pb y 2630pb y con la doble digestión XhoI y SspI bandas de 730 pb, 940 pb, 992 pb, 1177 pb, 2362 pb y 2630 pb. Para visualizar los productos de la digestión se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Con flechas se indica el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión. PM: Marcador de peso molecular. SD: plasmidio sin digerir.

Con el vector final de pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP (Figura 18.B), se procedió a transformar *S. cerevisiae* quimiocompetentes (Sección 6.2.3.3.).

Se obtuvieron colonias transformantes para las células de *S. cerevisiae* que adquirieron el plasmidio pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP (Figura 19) que sería usado como control negativo en los ensayos, debido a la auxotrofia que posee la cepa de levaduras usada (BY4742).

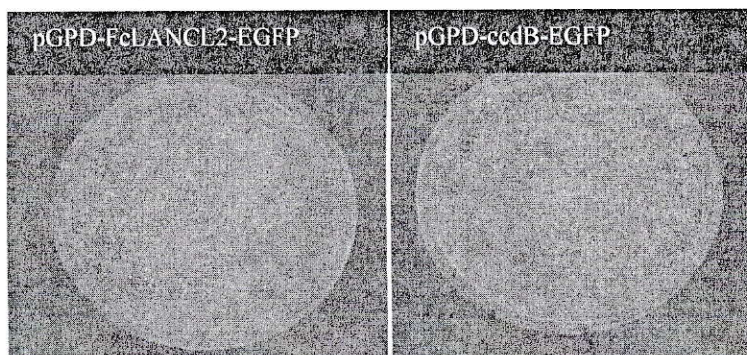


Figura 19: *Saccharomyces cerevisiae* transformante con pAG426-GPD-FCLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP. Se transformaron *S. cerevisiae* de la cepa BY4742 quimiocompetentes y se crecieron en medio mínimo YMM sólido que carece de uracilo como selección auxotrófica. Luego de 48 horas se observaron colonias en las placas de cultivo.

7.12. Análisis de la acumulación de la proteína Fc-LANCL2-EGFP en *Saccharomyces cerevisiae*.

Para evaluar la expresión y acumulación de la proteína fusionada a EGFP, en las colonias de *S. cerevisiae* se seleccionaron 10 colonias de las placas pGPD-FcLANCL2-EGFP y pGPD-ccdB-EGFP (Sección 7.11), las cuales se crecieron en medio YMM líquido por 48 horas. Se analizó la presencia e intensidad de la fluorescencia utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus IX70, de cada colonia (clones). Las levaduras de diferentes colonias presentaban variación en la intensidad de la fluorescencia (Figura 20), e incluso se pudo observar fluorescencia en levaduras que presentaban pGPD-ccdB-EGFP (Figura 20.C).

De las colonias observadas se seleccionaron las del clon 1 (Figura 20.A) y el clon 5 (Figura 20.B) de las levaduras transformadas con el plasmidio pGPD-FcLANCL2-EGFP, esto en base a la intensidad de la fluorescencia que presentaban las células. Para las levaduras transformadas con el vector sin inserto, pGPD-ccdB-EGFP, se seleccionó el clon 3 (Figura 20.C), que presentaba una leve fluorescencia de distribución en toda la célula, similar a la

de los demás clones.

A. pGPD-FcLANCL2-EGFP
Clon 1

B. pGPD-FcLANCL2-EGFP
Clon 5

C. pGPD-si-EGFP
Clon 3

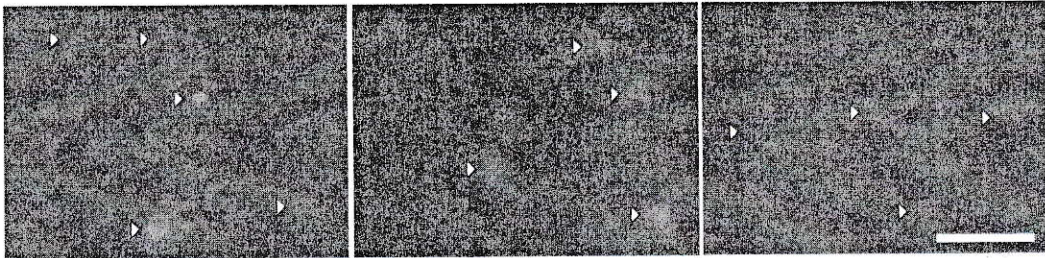


Figura 20: Expresión de EGFP en pGPD-FcLANCL2-EGFP y pGPD-ccdB-EGFP en *S. cerevisiae*. Las células de *S. cerevisiae* transformadas con el vector pGPD-FcLANCL2-EGFP, clon 1 (A) y clon 5 (B) y pGPD-ccdB-EGFP, clon 3 (C) se observaron en el microscopio de fluorescencia a 40x bajo las mismas condiciones de captura de imagen (apertura y tiempo de exposición). La barra de tamaño indica 20 μm . Con flechas se indican las levaduras observadas.

Para poder diferenciar la ubicación subcelular de las proteínas fluorescentes, estas colonias seleccionadas se observaron al microscopio confocal Zeiss LMS 710.

Para esto las levaduras se crecieron en medio YMM líquido por 24 horas a 30°C con agitación constante agregando el trazador vacuolar FM4-64 a una concentración final del 3 μM , esto para delimitar la vacuola de estas células y poder distinguir la ubicación de la proteína de fusión a EGFP.

Para los clones 1 y 5 con el inserto FcLANCL2-EGFP se puede observar la localización de la proteína FcLANCL2-EGFP (Figura 21.A y B), concentrada en un cuerpo pequeño endosomal. Al visualizar el trazador FM4-64 se puede observar la presencia de la vacuola con morfología normal (Figura 21. D y E), al igual que en las levaduras control (pAG426-GPD-ccdB-EGFP, Figura 21.F). El cuerpo con EGFP no colocaliza con las vacuolas pero

se encuentran muy cercanos a ella (Figura 21 G y H). Sin embargo los clones 1 y 5 para FcLANCL2-EGFP no presentan la misma intensidad de señal para la proteína fusionada a EGFP, lo cual podría deberse a la diferencia de expresión y acumulación de proteína que presentan.

Para el caso del clon transformado con el vector pAG426-GPD-ccdB-EGFP, se puede observar una leve señal para EGFP, pero ésta tiene una distribución citoplasmática (Figura 21.C). La expresión y acumulación de la proteína GFP utilizando este vector se ha reportado (Vásquez 2013). La diferencia en la distribución de EGFP indica que en las levaduras transformadas con pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP se está acumulando una proteína de fusión que es distinta a la proteína soluble EGFP.

La evidencia de que la proteína FcLANCL2 se encuentra presente en cuerpos intracelulares nos ayudó a diseñar la estrategia a seguir para realizar los ensayos de unión a ABA y probar la funcionalidad de FcLANCL2 de ser receptor de esta hormona.

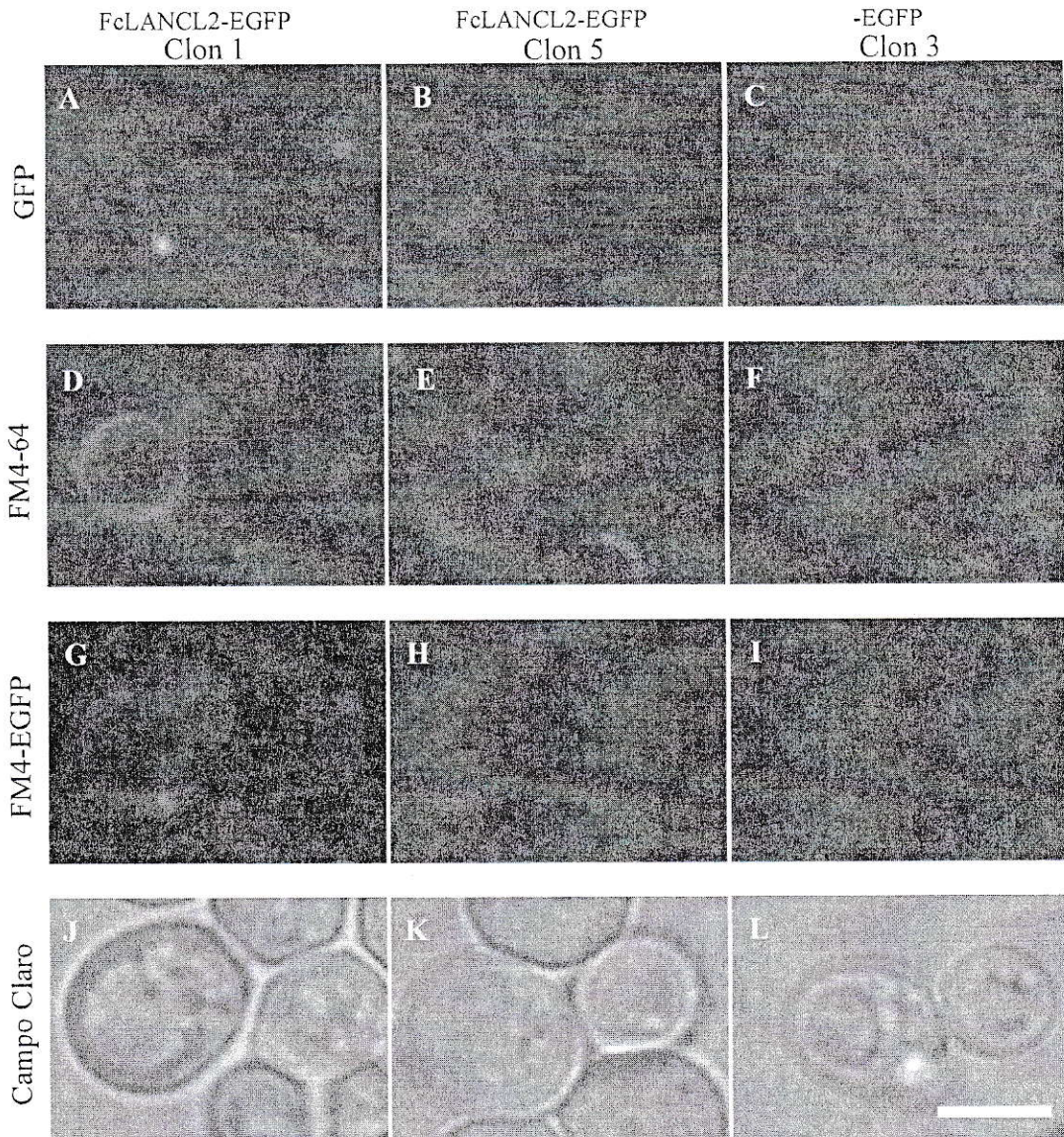


Figura 21: Análisis de la distribución subcelular de la proteína FcLANCL2 en *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* que acumulan la proteína FcLANCL2-EGFP o son portadoras del vector pGPD-si-EGFP (expresan EGFP) fueron incubadas con FM4-64 (3 μ M) por 24 horas, permitiendo así demarcar la membrana vacuolar. La figura muestra una imagen representativa de los distintos campos observados. Para cada imagen se muestra la fluorescencia emitida por EGFP (primera fila), la del marcador FM4-64 (segunda fila), la superposición de EGFP en verde y FM4-64 en rojo (tercera fila) y el campo claro (cuarta fila). Las células se excitaron a 488 nm de longitud de onda para GFP y a 514 nm de longitud de onda para FM4-64. En tanto la captura de la emisión fue de 505 a 530 nm para GFP y de 560 nm y mayores para FM4-64. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Zeiss 710 con un aumento

óptico de 63x y un aumento digital del 4x. Este análisis se realizó tres veces para cada colonia transformante. Cada imagen posee una barra de tamaño que corresponde a 5 μm .

7.13 Análisis de la expresión de FcLANCL2-EGFP en *Saccharomyces cerevisiae*

Las proteínas se extrajeron según lo señalado en la sección 6.2.11.4.1. Luego de revelar la membrana de nitrocelulosa en placas radiográficas, se pudo observar que las levaduras que presentaban -EGFP muestran una banda de un tamaño aproximado de 30 kDa, lo cual concuerda con el tamaño de EGFP reportado en la literatura (Tsien, 1998). Al observar las levaduras transformadas con FcLANCL2-EGFP se puede observar una banda de un tamaño aproximado de 75 kDa, lo cual es lo esperado para la proteína FcLANCL2-EGFP (Figura 22) . Los carriles que muestran en símbolo (*) fueron extracciones de proteínas con otro método de extracción (método de Laemmli, 197), en ellas no se ven bandas definidas, lo cual se debería por que la extracción de proteínas no es la adecuada para proteínas de membrana.

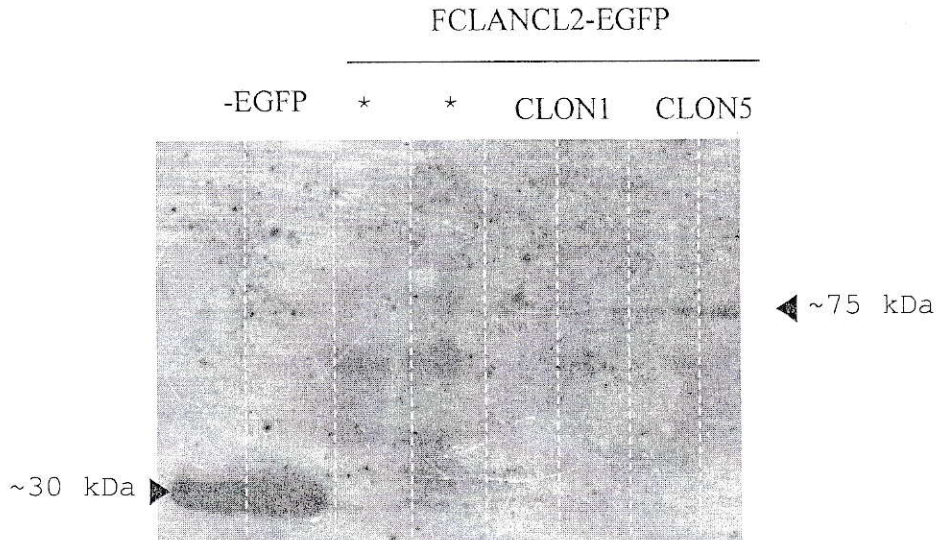


Figura 22: Western Blot anti-EGFP a las proteínas extraídas desde *Saccharomyces cerevisiae*. En el carril 1 y 2 correspondiente a EGFP, se observa una banda de aproximadamente 30 kDa correspondiente a EGFP. En los carriles correspondientes a FCLANCL2-EGFP, para el clon 1 y 5 se observa una banda de aproximadamente 75 kDa correspondiente a la proteína fusionada. Anticuerpo secundario usado anti-mouse-IgG Peroxidase. Revelado en placa radiográfica.

7.14. Obtención de esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* que acumulan la proteína de fusión FcLANCL2-EGFP.

Los esferoplastos son células de levadura a las cuales se les ha removido la pared celular por acción de enzimas que degradan ésta (Figura 23). Se obtuvieron esferoplastos para facilitar la entrada de [³H]-ABA y ABA a las levaduras y así poder desarrollar los ensayos de unión (Sección 6.2.12.2).

Con la evidencia obtenida que la proteína de fusión se localiza en una membrana celular (Sección 7.12), es que se procedió a la obtención de esferoplastos desde cultivo líquido con las levaduras transformadas con pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP (Clon 1 y 5) y pAG426-GPD-ccdB-EGFP (Clon3) (6.2.12.1). Cabe destacar que se usaron levaduras que fueron transformadas y no se usaron las de tipo silvestre, porque las transformadas

presentaban auxotrofia a uracilo en el medio de crecimiento y de selección, carácter ausente en las cepas silvestre. Este carácter permitió comparar entre estas dos cepas, ya que las levaduras de la cepa BY4742 que poseen el plásmido, crecen en ausencia de uracilo. Al comparar esta cepa con la silvestre existen mayores diferencias de proliferación en los distintos medios de crecimiento y una mejor selección de los esferoplastos, que luego se usaron en los ensayos de unión. Resuspendidos los esferoplastos en la solución tampón de membrana, se determinó la integridad de los estos, los cuales poseían los insertos pAG426-GPD-FcLANC-LIK2-EGFP (clon 1 y clon 5) y pAG426-GPD-ccdB-EGFP (clon 3) mediante el microscopio óptico Nikon Eclipse E2 (Figura 24).

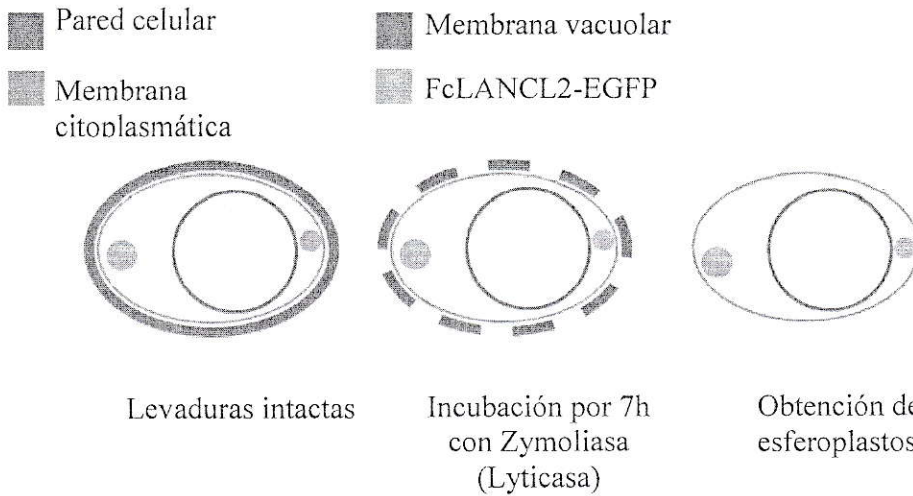


Figura 23: Representación gráfica de la obtención de esferoplastos desde células intactas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se crecieron las levaduras con los insertos pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP hasta que alcanzaron la fase exponencial y se incubó con la enzima Zymoliasa por 7 horas, durante las cuales se monitorio la acción de la Zymoliasa evaluando su sensibilidad a cambios en la presión osmótica.

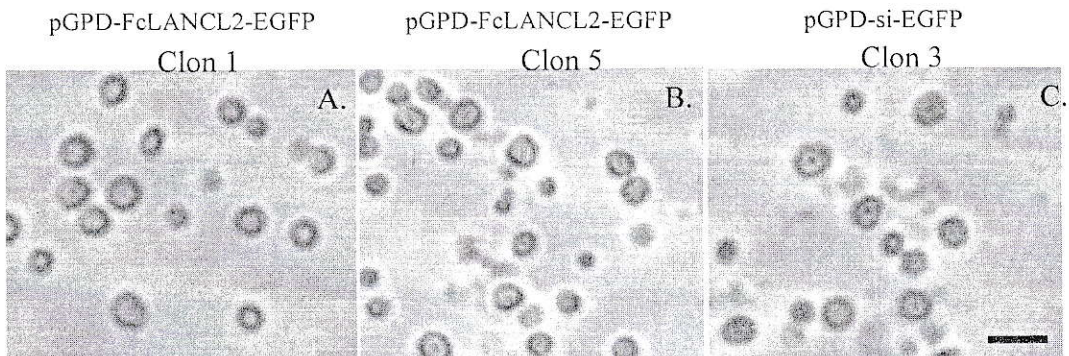


Figura 24: Esferoplastos desde levaduras con el inserto pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP y pAG426-GPD-ccdB-EGFP. Luego del tratamiento con la enzima Zymoliasa, se obtuvieron esferoplastos para pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP Clon 1 (A), pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP Clon 5 (B) y pAG426-GPD-si-EGFP(C). Los esferoplastos fueron observados a un aumento de 40x, en el microscopio óptico Nikon Eclipse E2. La barra de tamaño indica 10 μm .

7.15. Ensayo de Unión de FcLANCL2-EGFP a [³H]-ABA

Para evaluar la funcionalidad del producto génico de FcLANCL2 de ser un receptor de ABA, se incubaron los esferoplastos permeabilizados con detergente para permitir el acceso de la hormona. Se utilizaron iguales cantidades de proteína de los esferoplastos obtenidos en la sección 7.13, con [³H]-ABA (DL-CIS, TRANS-[G-³H]-ABA, Perkin Elmer). Obteniéndose así que el clon 1 y el clon 5, que acumulan la proteína de fusión FcLANCL2-EGFP, a los 30 minutos de incubación con [³H]-ABA acumulan una mayor cantidad de ABA que los esferoplastos del clon 3 que acumulan EGFP (SI) en el citoplasma. Se aprecia que el número de nMoles incorporados por mg de proteína es mayor y estadísticamente diferente en estos clones que en el control. Este resultado indica que la proteína FcLANCL2-EGFP estaría uniendo [³H]-ABA en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae* en los clones que expresan el gen de *F. chiloensis*.

Se aprecia también que los nMoles incorporados de ABA por mg de proteína luego de 1 hora de incubación son siempre significativamente menores estadísticamente que a 30 minutos de incubación. Lo cual indicaría que la unión de ABA con el receptor se generaría a los 30 minutos de incubación y sería transiente.

Tras una hora de incubación no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los clones evaluados tanto para los que acumulaban FcLANCL2-EGFP como para los que acumulaban la proteína EGFP sola.

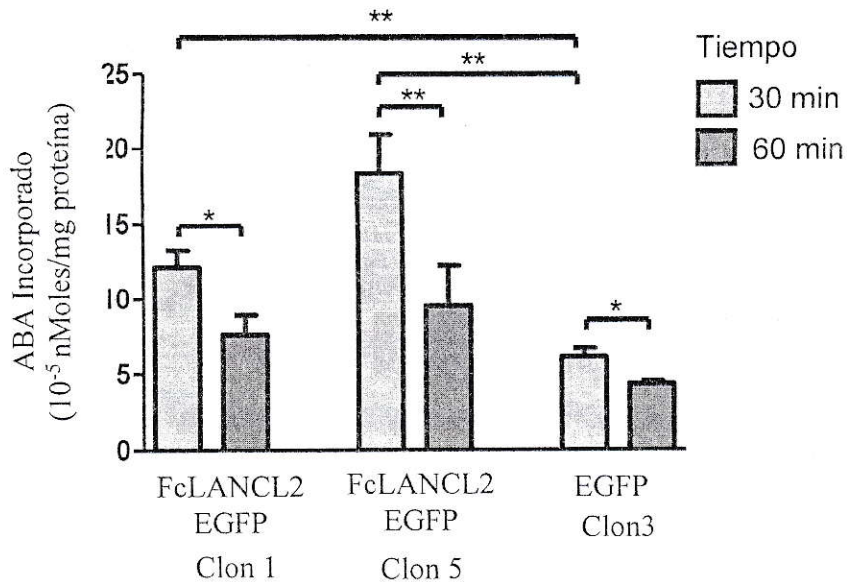


Figura 25: Ensayo de unión de [³H]-ABA en esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*. La unión de [³H]-ABA es reportada en nMoles de ABA incorporados. Se incubó 1 μ M de (\pm) ABA con 0.2 μ Ci de [³H]-ABA. Se muestra el clon 1 y 5 de las levaduras transformadas con el plasmidio pGPD-FcLANCL2-EGFP, y el clon 3 con pGPD-ccdB-EGFP (SI). En gris claro se muestra el tiempo de incubación de 30 minutos y en gris oscuro 1 hora de incubación. Se cuantificaron los centellos por minuto (CPM) y se normalizaron a número de nMoles de ABA incorporados por mg de proteína presentes en los esferoplastos. El experimento se realizó con una réplica biológica y tres réplicas técnicas. Análisis estadístico prueba t ($p < 0.05$).

Así mismo, con el clon 5 de FcLANCL2-EGFP, que reportó mayores niveles de unión comparados con EGFP (Figura 25), se realizaron ensayos con distintas concentraciones de ABA (100 nM y 1 μ M), para este modo evaluar si la unión era dependiente de la concentración de ABA presente. Se observó mayor unión al receptor FcLANCL2-EGFP cuando la concentración de ABA es de 1 μ M, presentando una diferencia de hasta 30 veces más unión al emplear la concentración de 1 μ M con respecto de la de 100 nM (Figura 26). También se observa que con 100 nM de ABA, existen diferencias significativas a 1 hora de incubación entre los esferoplastos que acumulan FcLANCL2-

EGFP (clon 5) y los que acumulan EGFP. La unión es dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de ABA, presentando diferencias significativas entre los esferoplastos que acumulan FcLANCL2-EGFP (clon 5) y los que acumulan EGFP (clon 3) entre los diferentes tiempos de incubación (30 minutos y 1 hora) y las diferentes concentraciones de ABA (100 nM y 1 μ M).

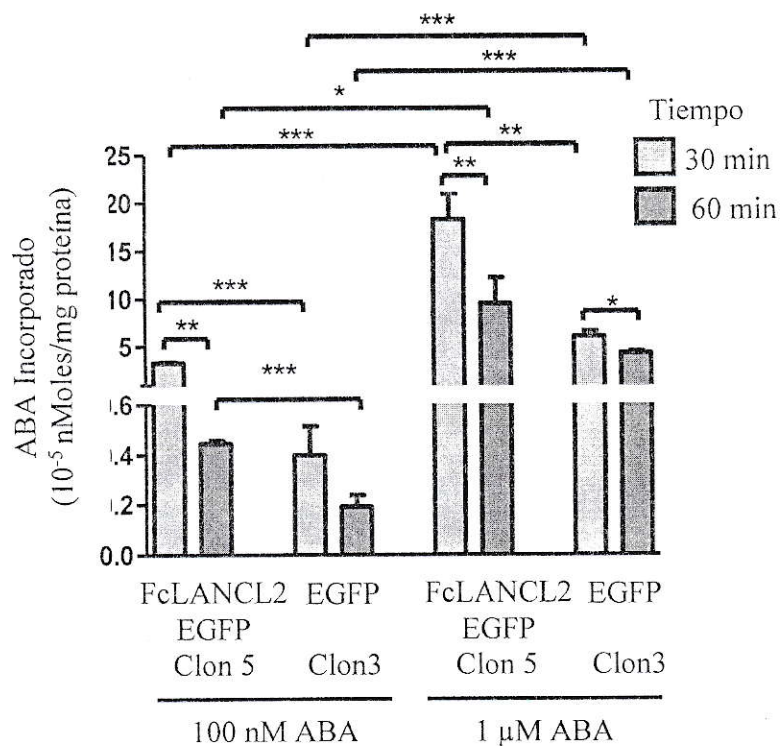


Figura 26: Ensayo de unión de $[^3\text{H}]$ -ABA en esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*, con ABA 100 nM y 1 μ M. La unión de $[^3\text{H}]$ -ABA es reportada en nMoles/mg de proteína. Se incubó 100 nM y 1 μ M de (\pm) ABA con 0.2 μ Ci de $[^3\text{H}]$ -ABA. Se muestra el clon 5 de las levaduras con el plasmidio pGPD-FcLANCL2-EGFP, y el clon 3 de pGPD-ccdB-EGFP (EGFP). Se cuantificaron los centellos por minuto (CPM) y se normalizaron a número de nMoles de ABA incorporados por mg de proteína presente en los esferoplastos. El experimento posee una réplica biológica y tres réplicas técnicas. Análisis estadístico prueba t ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1. Los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* presentan regiones conservadas características de las familias génicas a las cuales pertenecen.

Para *FcLANCL2*, obtuve la secuencia de ADN codificante, que comprendía el marco de lectura abierta de este gen. La secuencia desde ADN genómico no se pudo obtener, ya que se presentaron problemas de ligación al vector pCR8/GW/TOPO. Hasta la culminación de esta tesis no se ha podido obtenerla, lo cual puede deberse a que su tamaño era demasiado (aproximadamente 2500 pb) para clonar y/o a que la cantidad del producto de PCR era muy poca para llevar a cabo la reacción de ligación. Sin embargo, a pesar de incrementar la cantidad de producto de PCR, y el tiempo de ligación, no se obtuvieron colonias de *E. coli* transformantes que presentaran la secuencia de *FcLANCL2* desde ADN genómico.

Al analizar la secuencia aminoacídica proveniente del ADN codificante se destaca que la secuencia presenta los dominios característicos de la familia de los LANCL2, ya que posee 7 dominios transmembrana que haría que esta proteína se localizara en una membrana. Además posee dos sitios para la unión de zinc y tres sitios activos para la correcta deprotonación de la molécula de afinidad y su correcta ciclación, los cuales otorgarían la capacidad de unir ABA. Estas propiedades concordarían con las de LANCL2 que ha sido descrita en humanos caracterizándose como una proteína que une ABA, localizada en la membrana plasmática con el sitio de unión a ABA hacia el lado citoplasmático de los glóbulos rojos (Vigliariolo y col. 2015). Esta proteína, *FcLANCL2*, difiere del receptor acoplado a la proteína G específicamente en que este último posee 4 dominios transmembrana en su secuencia, en comparación con los 7 que presentan las proteínas de

la familia de los LANCL2.

Se aisló la secuencia desde el ADN genómico y ADN complementario del gen *FcARP*. Al comparar ambas secuencias se dedujo que la estructura del gen corresponde a 4 exones y 3 intrones generando un producto génico de 9.65 kDa. El producto génico de FcARP posee un dominio conservado para la familia de los genes reprimidos por auxina (Stafstrom y col., 1998). En base a la secuencia, se esperaba que el clonamiento de ADN complementario del gen considerara el marco de lectura completo, sin embargo en diciembre del 2014, se realizó un estudio de transcriptómica de *F. chiloensis*, el cual mostró que la secuencia del gen *FcARP* identificado en esta tesis estaba incompleta hacia el extremo 5' (datos aún no publicados de nuestros colaboradores en la Universidad de Talca). También se ha publicado que en *F x ananassa* la proteína ARP tiene un peso molecular de 12.5 kDa (Reddy y col., 1990), lo cual también indica que la secuencia que se obtuvo de FcARP se encuentra incompleta en el extremo 5'. Sin embargo el dominio que le da la funcionalidad al gen se encuentra hacia el extremo 3'.

Al aislar la secuencia de *FcSAUR* desde ADN genómico y complementario se encontró que no posee intrones lo cual es característico de la familia SAUR (Ren y col., 2015). El análisis de transcriptómica realizado en la Universidad de Talca indica que la secuencia obtenida es la misma que se logró clonar y secuenciar en esta tesis, indicando que la secuencia que poseemos presenta el marco de lectura abierto completo del gen.

8.2. Los niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* varían a lo largo de los estadios de desarrollo del fruto, en distintas temporadas de cosecha.

Se obtuvo que los niveles de transcrito de *FcLANCL2* eran similares entre las temporadas

del 2013 y 2014, pero muy diferentes en el estadio C4 con respecto a la temporada del 2012. Esta variación podría deberse a que las condiciones climáticas presentadas en el 2012 fueron diferentes a las del 2013 y 2014 (<http://agromet.inia.cl/>). Esto sugiere una regulación post transcripcional para *FcLANCL2*, dependiente de las condiciones del medio ambiente. Así mismo, este gen al ser propuesto como un posible receptor de ABA, se esperaría que sus niveles vayan aumentando conforme los niveles de esta hormona incrementa, sin embargo no es el único receptor de ABA que posee este fruto (Lizana y col., 2014). Este receptor podría no estar siendo requerido para el último estadio del fruto o se habría estado acumulando en los estadios previos de su desarrollo.

En las tres temporadas, se presentaron los mismos patrones de niveles de transcrito del gen *FcARP*, por lo cual podríamos decir que los niveles de transcrito de este gen no son afectados por las condiciones ambientales que presentaron las distintas temporadas. Los mayores niveles de transcrito se encuentran en los estadios de C1 y C2, lo cual discrepa con la categorización de este gen al ser descrito como un gen reprimido por auxina. Sin embargo se ha demostrado que el gen ARP en otros frutos posee un comportamiento similar al encontrado en *F. chiloensis* (Shi y col., 2013). También se ha descrito que este gen responde a tratamientos con auxina (Lee y col., 2013), lo cual coincidiría con que los niveles de transcrito del gen sean mayores en los estadios de C1 y C2. El dominio ARP de este gen también está asociado a la dormancia de la semilla (Rae y col., 2013), lo cual sería indicador que al disminuir los niveles de transcrito de este gen en C3 y C4, el embrión dentro del aquenio se encontraría maduro, lo cual se comprobó mediante el rescate de embriones realizado por la Dra. Analía Espinoza (trabajo no publicado).

Los niveles de transcrito de *FcSAUR* varían en las diferentes temporadas de cosecha. Entre

la temporada del 2013 y 2014 el patrón de nivel de transcrito es muy similar (aumenta hacia el estadio de C4), sin embargo en la temporada del 2012 difiere en el estadio de C4, en el cual los niveles de transcrito decaen 3 veces con respecto al estadio de C3, pudiendo esto deberse a las diferentes condiciones ambientales entre el 2012 y las temporadas 2013-2014.

El gen *FcSAUR* posee un dominio inducible por auxina, sin embargo se ha reportado que un pequeño grupo de genes pertenecientes a la familia SAUR en *A. thaliana* se reprime por auxinas. Al hacer BLAST contra la base de datos de *A. thaliana* (www.arabidopsis.org) se encontró que este gen posee mayor identidad con el gen *AtSAUR78*, que se encuentra dentro de este pequeño grupo de genes SAUR reprimidos por auxinas (Rem y col., 2015), lo cual coincidiría con el patrón observado de este gen en las temporadas del 2013 y 2014.

8.3. FcLANCL2 responde a los tratamientos con ABA y auxina.

Se obtuvo que *FcLANL2* responde a ambas hormonas, ABA y la auxina NAA, de manera diferencial. Se ha reportado que estas hormonas participan en el proceso de desarrollo de frutos no climatéricos y en especial para el género *Fragaria* (Symons y col., 2012). Lo encontrado al analizar las veces de cambio de *FcLANCL2* frente al tratamiento con ABA es de alrededor de 3.5 veces de cambio luego de 12 horas del pulso hormonal. Al *FcLANCL2* responder positivamente a ABA sugeriría que posee una auto-regulación dependiendo de los niveles de ABA que se censan en la célula, una propiedad que se ha visto para otros genes (Beckskei y col., 2001). Al observarse también respuesta a NAA, el cual aumenta casi 8 veces 30 min luego del pulso hormonal, afirmaríala implicancia de ambas hormonas a lo largo del desarrollo del fruto.

Al buscar en el genoma de *F. vesca* la secuencia promotora para el gen *FvLANCL2*, con el cual *FcLANCL2* presente una alta identidad aminoacídica y nucleotídica, se encuentra que la secuencia promotora del gen *FvLANCL2* posee motivos regulatorios de respuesta a hormonas como ABA y auxinas. Es así que sería interesante obtener la secuencia promotora del gen *FcLANCL2*, y así poder identificar si los motivos presentes en *F. vesca* se conservan en *F. chiloensis*.

También, al observar los niveles de transcrito de los genes que se usaron como marcadores de que los tratamientos hayan funcionado se pudo observar que *FcNCED* aumentaba sus niveles de transcrito y este incremento se puede homologar al incremento de ABA en el fruto (Symons y col., 2012 y Jia y col., 2011). Además el patrón de expresión de *FcARF2*, que se empleó para evaluar la efectividad de tratamiento con NAA, se puede homologar al patrón de acumulación de auxina en frutos del género *Fragaria* (Symons y col., 2012). Sin embargo, sería ideal poder contar con los niveles reales de ambas hormonas en los distintos estadios del desarrollo del fruto.

8.4. En *S. cerevisiae* la acumulación de la proteína FcLANCL2-EGFP se observa en un cuerpo intracelular.

Las colonias obtenidas luego de la transformación de *S. cerevisiae* con el plasmidio *FcLANCL2-EGFP*, poseían distinta intensidad de señal fluorescencia, lo cual puede deberse a las diferencias en la acumulación de proteínas que presentan las distintas colonias entre sí. La diferente acumulación de proteínas podría deberse a que el plasmidio en *S. cerevisiae* se encuentra en multicopia de lo que depende el nivel de expresión de la proteína *FcLANCL2-EGFP*, y por ello todos clones no responden de la misma manera.

Al observar los distintos clones seleccionados de acuerdo a la intensidad de la señal de

EGFP, al microscopio confocal, se obtuvo que FcLANCL2-EGFP presentaba cuerpos intracelulares cercanos a la vacuola los cuales no se encontraban en las levaduras que acumulaban EGFP de manera citoplasmática (transformadas con el vector pAG426-GPD-ccdB-EGFP), indicando que la localización de estos cuerpos intracelulares se debería a la transformación de la proteína de fusión FcLANCL2-EGFP. La proteína FcLANCL2-EGFP se esperaba que se localizara en la membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*, al igual que se localiza en la membrana plasmática de los glóbulos rojos en humanos (Vigliarolo y col., 2015). Sin embargo esto no fue así confirmando lo que ha sido reportado anteriormente en cuanto que al expresar proteínas en un organismo heterólogo no siempre poseen la misma ubicación subcelular (Molbaek y col., 2015). Sin embargo, la proteína posee 7 dominios transmembrana, por lo cual al encontrarla en un cuerpo intracelular sigue que la conformación como una proteína de membrana se mantiene en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae*.

8.5. Las levaduras transformantes presentan acumulación de FcLANCL2-EGFP.

Así mismo al realizar un western blot anti-EGFP, para detectar la presencia de la proteína, se observa que las levaduras que poseen el vector vacío, presentan una banda con peso molecular de la proteína EGFP sola, y en las colonias de levadura transformadas con FcLANCL2-EGFP esta banda de EGFP desaparece y aparece una banda de mayor tamaño, de aproximadamente 75 kDa, tamaño esperado para la proteína FcLANCL2 fusionada a EGFP. Por ende, las levaduras que observamos en el confocal con el vector vacío, la fluorescencia emitida es la presencia de la proteína EGFP, y la fluorescencia que se emite en las levaduras transformadas con FcLANCL2-EGFP, es debido a la presencia de la proteína de interés FcLANCL2-EGFP.

Ambas evidencias, nos indican que la proteína que observamos en el cuerpo intracelular es FcLANCL2 fusionada a EGFP, la cual la podemos detectar mediante microscopia confocal y mediante Western-Blot.

8.6. Los esferoplastos que acumulan la proteína FcLANCL2-EGFP unen [³H]-ABA en *Saccharomyces cerevisiae*.

Al observarse diferencias al comparar a 30 min de incubación a 25°C entre los esferoplastos procedentes de colonias de levadura que presentaban pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP con respecto a la colonia que presenta pAG426-GPD-ccdB-EGFP, se puede sugerir fuertemente que en el sistema probado, la proteína FcLANCL2 es capaz de unir ABA, al igual que la proteína homóloga LANCL2 en glóbulos rojos de humanos (Vigliarolo y col., 2015).

También se probaron distintos tiempos de incubación con ABA. A una hora de incubación no se encontraron diferencias significativas entre los esferoplastos procedentes de colonias de levadura que presentaban pAG426-GPD-FcLANCL2-EGFP con respecto a la colonia que presenta pAG426-GPD-ccdB-EGFP, sugiriendo esto que la unión entre el receptor y ABA es transiente (Li y col., 2014). Esto concordaría con la definición biológica de receptor. Este tipo de ensayos ha sido realizado anteriormente exitosamente para definir la funcionalidad de ciertos receptores hormonales tanto para ABA y etileno (Kharenko y col., 2013 y Schaller y col., 1995).

La unión observada entre los esferoplastos que no acumulaban la proteína de estudio puede deberse a las uniones inespecíficas que se generan entre las membranas de las levaduras con el [³H]-ABA que se incubó. Es así, que un resultado similar para otra proteína receptora de ABA ha sido reportado por Khareko y col., 2013, en donde se

muestra que existe un nivel basal de unión distinto de cero, entre las levaduras que se usaron sin el gen inserto y la hormona con la cual se incubó. Sin embargo, cabe destacar que no hay referencias de la presencia del gen FcLANCL2 en levaduras y por esta razón no fue necesario un control negativo de tratamiento de levaduras sin transformar con ABA.

Se probó que la unión de [³H]-ABA con el receptor FcLANCL2-EGFP era dependiente la concentración de ABA lo cual se ha reportado para otros receptores de ABA, en los cuales la afinidad de unión es dependiente de la concentración de ABA presente (Liu y col., 2007, He y col., 2014 y Kharenko y col., 2013).

9. CONCLUSIONES

- Se identificaron los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* de *F. chiloensis*.
- Las secuencias aminoacídicas de *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* poseen alta identidad con sus secuencias homologas en *F. vesca*, presentando dominios conservados característicos de sus familias génicas correspondientes.
- Los niveles de transcrito de los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* varían en los distintos estadios de desarrollo del fruto del *F. chiloensis*.
- La expresión diferencial de *FcARP* en fruto de *F. chiloensis* es similar en las tres temporadas de cosecha diferentes, lo cual indica que los niveles de transcrito de este gen no se ven afectados por factores medio ambientales, los cuales fueron diferentes en las tres temporadas de cosecha.
- La expresión diferencial de *FcLANCL2* y *FcSAUR* es similar en las temporadas 2013 y 2014, pero distinta para ambos genes en 2012, lo cual sugiere que las condiciones medio ambientales como temperatura, cantidad de precipitación, horas frío entre otros, afecta la expresión diferencial de estos genes.
- El patrón de expresión de *FcARP* coincide con la función biológica de dormancia asociada a este gen.
- El patrón de expresión para los niveles de transcrito del gen *FcSAUR* correlaciona con la función de auxina en la elongación de las células en los estadios finales de desarrollo.

- El patrón creciente de expresión del gen *FcLANCL2* se correlaciona con la importancia de ABA para el desarrollo del fruto, y el que sea requerido para sensar ABA.
- El gen *FcLANCL2* en frutos de *F. chiloensis* es sensible a los tratamientos con ABA y auxina exógena.
- La respuesta del gen *FcLANCL2* frente a los tratamientos con ABA sugiere un loop regulatorio positivo de esta hormona con el receptor, ya que los niveles de transcrito del gen aumenta conforme el tiempo de incubación va aumentando.
- El patrón de los niveles de transcrito de los genes reporteros de ABA y auxina, *FcNCED* y *FcARF2* respectivamente, sugirieron que el patrón de acumulación de estas hormonas a lo largo del desarrollo de fruto de *F. chiloensis* es similar al observado en *F. x ananassa*.
- La proteína FcLANCL2-EGFP localizada en un cuerpo intracelular, es capaz de aumentar la unión de ABA de esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*.
- La unión de ABA inducida por FcLANCL2-EGFP es transiente y dependiente de la concentración de ABA, lo que es consistente con ser una proteína receptora de ABA.
- *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* se expresan diferencialmente en los estadios del desarrollo de fruto, *FcLANCL2* es regulado por ABA y auxina, y cumple la función biológica de ser un receptor de ABA.

Es así que con el trabajo realizado en el desarrollo de esta tesis, se comprueba a hipótesis, ya que los genes *FcLANCL2*, *FcARP* y *FcSAUR* se expresan diferencialmente a lo largo

de desarrollo del fruto, el gen *FcLANCL2* responde a los tratamientos hormonales de ABA y auxina exógena, y el producto génico de *FcLANCL2* es capaz de unir ABA.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Baggett, J. J., Shaw, J. D., Sciambi, C. J., Watson, H. a, & Wendland, B. 2003. Fluorescent labeling of yeast. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]*, Chapter 4, Unit 4.13. doi:10.1002/0471143030.cb0413s20
- Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Shiozaki S, Goto-Yamamoto N, Horiuchi S. 2003. Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 586–589.
- Beeskei, a, Seraphin, B., & Serrano, L. 2001. Positive feedback in eukariotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *The EMBO Journal*, 20(10), 2528–2535.
- Böttcher, C., Keyzers, R. a, Boss, P. K., & Davies, C. 2010. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3615–25. doi:10.1093/jxb/erq174
- Chai, Y.-M., Jia, H.-F., Li, C.-L., Dong, Q.-H., & Shen, Y.-Y. 2011. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 5079–89. doi:10.1093/jxb/err207
- Chen, J. G., & Ellis, B. E. 2008. GCR2 is a new member of the eukaryotic lanthionine synthetase component C - like protein family, 1(May), 307–310. doi:10.1111/j.1365
- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. 2014. “Movers and shakers” in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 1–18. doi:10.1093/jxb/eru280
- Daminato, M., Guzzo, F., & Casadoro, G. 2013. A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *Journal of Experimental Botany*, 64(12), 3775–86. doi:10.1093/jxb/ert214
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tis- sue. *Focus* 12:13–15
- Figueroa, C. R., Opazo, M. C., Vera, P., Arriagada, O., Díaz, M., & Moya-León, M. A. 2012. Effect of postharvest treatment of calcium and auxin on cell wall composition and expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit. *Food Chemistry*, 132(4), 2014–2022. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.041

Figuerola, C. R., Pimentel, P., Gaete-Eastman, C., Moya, M., Herrera, R., Caligari, P. D. S., & Moya-León, M. A. 2008. Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 49(2), 210–220. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.01.018

Gietz, B. R. D., Woods, R. a, & Peg, D. N. a. 2002. Transformation of Yeast by Lithium Acetate / Single-Stranded Carrier DNA / Polyethylene Glycol Method, 350(2001), 87–96.

Giovannoni, J. J. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 283–9. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.008

Given NK, Venis MA, Gierson D. 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174, 402–406.

González G, Fuentes L, Moya-León M, Sandoval C, Herrera R. 2013. Characterization of two PR genes from *Fragaria chiloensis* in response to *Botrytis cinerea* infection: A comparison with *Fragaria x ananassa*. *Physiological and Molecular Plant*

He, Y., Hao, Q., Li, W., Yan, C., Yan, N., & Yin, P. 2014. Identification and Characterization of ABA Receptors in *Oryza sativa*. *PloS One*, 9(4), e95246. doi:10.1371/journal.pone.0095246

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), 188–99. doi:10.1104/pp.111.177311

Kharenko, O. a, Choudhary, P., & Loewen, M. C. 2013. Abscisic acid binds to recombinant *Arabidopsis thaliana* G-protein coupled receptor-type G-protein 1 in *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 68, 32–6. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.025

Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J., & Klee, H. J. 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell*, 6(4), 521–30. doi:10.1105/tpc.6.4.521

Lee, J., Han, C.-T., & Hur, Y. 2013. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, BrARP1 and BrDRM1. *Molecular Biology Reports*, 40(1), 197–209. doi:10.1007/s11033-012-2050-9

Li, D., Li, Y., Zhang, L., Wang, X., Zhao, Z., Tao, Z., ... Yang, Y. 2014. Arabidopsis ABA receptor RCAR1/PYL9 interacts with an R2R3-type MYB transcription factor, AtMYB44. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8473–8490. doi:10.3390/ijms15058473

Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. 2007. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1712–6. doi:10.1126/science.1135882

Molbaek, K., Scharff-Poulsen, P., Helix-Nielsen, C., Klaerke, D. a, & Pedersen, P. 2015. High yield purification of full-length functional hERG K⁺ channels produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 15. doi:10.1186/s12934-015-0193-9

Nath, P. ; Bouzayen, M.; Mattoo, A.K. y Pech J.C. 2014. Fruit Ripening: Physiology, Signalling and Genomic. Pp 1-11. Boston, USA.

Nitsch JP. 1950. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany* 37, 211–215.

Opazo, M. C., Lizana, R., Pimentel, P., Herrera, R., & Moya-León, M. 2013. Changes in the mRNA abundance of FcXTH1 and FcXTH2 promoted by hormonal treatments of *Fragaria chiloensis* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 28–34. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.11.007

Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. R. 2013. Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4(June), 198. doi:10.3389/fpls.2013.00198

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(14), 1179–87. doi:10.1016/j.jplph.2010.03.006

Pronk, J. T. 2002. MINIREVIEWS Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research, 68(5), 2095–2100. doi:10.1128/AEM.68.5.2095

Rae, G. M., David, K., & Wood, M. 2013. The dormancy marker DRM1/ARP associated with dormancy but a broader role in planta. *Developmental Biology Journal*, 2013(July), 12. doi:10.1155/2013/632524

Reddy ASN, Poovaiah BW. 1990. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed messenger-RNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin regulated gene. *Plant Mol Biol* 14(2):127–136

Ren, H., & Gray, W. M. 2015. SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. *Molecular Plant*, 1–12. doi:10.1016/j.molp.2015.05.003

Schaller, G. E., & Bleecker, a B. 1995. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5243), 1809–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525372>

Shi, H.-Y., Zhang, Y.-X., & Chen, L. 2013. Two pear auxin-repressed protein genes, PpARP1 and PpARP2, are predominantly expressed in fruit and involved in response to salicylic acid signaling. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(2), 279–286. doi:10.1007/s11240-013-0321-3

Spartz, A. K., Lee, S. H., Wenger, J. P., Gonzalez, N., Itoh, H., Inzé, D., Gray, W. M. 2012. The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 70(6), 978–90. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04946.x

Stafstrom, J. P., Ripley, B. D., Devitt, M. L., & Drake, B. 1998. Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta*, 205(4), 547–552. doi:10.1007/s004250050354

Sturla, L., Fresia, C., Guida, L., Bruzzone, S., Scarfi, S., Usai, C., Zocchi, E. 2009. LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 28045–57. doi:10.1074/jbc.M109.035329

Symons, G., Chua, Y. ., Ross, J., Quittenden, L. ., Davies, N. W., & Reid, J. B. 2012. Hormonal Changes during non-climateric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709. doi:10.1093/jxb/err313

Tomato, T., & Consortium, G. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–41. doi:10.1038/nature11119

Urano, D., Chen, J., Botella, J. R., & Jones, A. M. 2013. Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom, (March).

Vigliarolo, T., Guida, L., Millo, E., Fresia, C., Turco, E., De Flora, A., & Zocchi, E. 2015. Abscisic Acid Transport in Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(21), 13042–13052. doi:10.1074/jbc.M114.629501

Vijay P, Pandey R and Girish C. 2011. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene, An overview. *J Food Sci Technol* (January–February 2012) 49(1):1–21 DOI 10.1007/s13197-011-0293-4

Wu, J., Liu, S., He, Y., Guan, X., Zhu, X., Cheng, L., Lu, G. 2012. Genome-wide analysis of SAUR gene family in Solanaceae species. *Gene*, 509(1), 38–50. doi:10.1016/j.gene.2012.08.002