



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“IDENTIFICACIÓN DE RUTAS METÁBOLICAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS CON PROPIEDADES AROMÁTICAS EN *FRAGARIA CHILOENSIS*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

JONATHAN ELÍAS MALDONADO SOTO

Dr. Herman Silva Ascencio
Director Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Patrocinante



Comisión de Evaluación

Dra. Lorena Norambuena Morales
Presidenta Comisión

Dr. Mauricio González
Evaluador

Santiago de Chile, marzo de 2010



UCH-FC
Biotecnología
M244
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**IDENTIFICACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS
DE COMPUESTOS CON PROPIEDADES AROMÁTICAS EN *FRAGARIA
CHILOENSIS***

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

JONATHAN ELÍAS MALDONADO SOTO

Octubre, 2009
Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Dr. HERMAN SILVA
Patrocinante: Dr. MICHAEL HANDFORD

BIOGRAFÍA



Jonathan Elías Maldonado Soto nació el 7 de febrero del año 1982 en Santiago de Chile. Cursó su Educación Media en el Liceo de Aplicación de Santiago, donde obtuvo el premio a la mejor promoción el año 1999. Desde temprana edad presentó interés por la ciencia y la tecnología, lo cual motivó su ingreso al Plan Común de la Escuela de Ingeniería de la Universidad de Chile en el año 2000. Luego de cursar 3 años, debe decidir entre las carreras que ofrece la Universidad y escoge aquella que cumple a cabalidad con sus expectativas de desarrollo, tanto profesional como intelectual. Así, en el año 2003 ingresa a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular dictada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Los conocimientos en programación adquiridos en la Facultad de Ingeniería le permiten iniciar, desde el primer año de carrera, una pasantía de investigación en el área de Bioinformática del proyecto de investigación "Genómica Funcional de Nectarines", que se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Chile. En ese laboratorio realizó su primera Unidad de Investigación, titulada: "Análisis Bioinformático para identificar genes ortólogos de los componentes del citoesqueleto en *Prunus persica*", bajo la dirección de la Dra. Lee Meisel. Los trabajos realizados en el proyecto de genómica funcional de nectarines se ven reflejados en dos papers de los cuales es coautor: Latorre y col, 2006 y Vizoso y col, 2009. Durante los siguientes 4 años continuó realizando diversas pasantías bajo la dirección del Dr. Herman Silva (Centro de Biotecnología Vegetal, U. Andrés Bello), del Dr. Aldo Solari (Facultad de Medicina, U. de Chile) y del Dr.

Alejandro Mass (Facultad de Ingeniería, U. de Chile). En el año 2007 comenzó su trabajo en el equipo de investigación de aroma en frutilla blanca del laboratorio de Genómica Funcional y Bioinformática Vegetal de la Universidad Andrés Bello, donde realizó su segunda Unidad de Investigación, titulada "Identificación de rutas metabólicas involucradas en la síntesis de compuestos con propiedades aromáticas en *Fragaria chiloensis*", bajo la dirección del Dr. Herman Silva. Este último trabajo fue continuado para desarrollar posteriormente el tema de su Tesis de Pregrado.



La presente Tesis la dedico a mis padres con admiración y agradecimiento.



AGRADECIMIENTOS



Deseo agradecer a quienes aportaron al desarrollo directo de esta investigación:

- Dr. Eduardo Agosin del Centro de Aroma de la Pontificia Universidad Católica de Chile, quién proporcionó el servicio de análisis de compuestos aromáticos de frutilla blanca, desarrollado en el marco de la tesis doctoral de Loreto Prat.
- Dr. Pablo Valenzuela del Instituto Milenio de Biología Fundamental Aplicada (MIFAB), quien nos facilitó el acceso a la genoteca y a los cDNAs de frutilla blanca.
- Dra. Marina Gambardella de la Pontificia Universidad Católica de Chile, quien proporcionó los ecotipos de *F. chiloensis*.
- Financiamiento:
 - Núcleo Milenio en Biotecnología Celular Vegetal (PCB) ICM P06-065-F
 - Proyecto interno UNAB DI-51-06/R.

Además, quiero agradecer a las distintas personas que han participado en mi formación:

- Comenzando por mi educación escolar, quisiera agradecer a dos profesores que recuerdo con cariño: Félix Ceballos y Marcela Sánchez.
- A quienes abrieron mis ojos a esta increíble carrera: Dra. May-Lin Almendras, Dra. Margarita Caru y Dr. Víctor Cifuentes.
- A quienes confiaron en mí desde el principio y por lo cual estoy profundamente agradecido: Dra. Lee Meisel y Dr. Herman Silva.
- A Nicolás Loira, un informático que me mostró el camino hacia la bioinformática.

- A quienes tuvieron la paciencia de enseñarme el mundo del trabajo en mesón, factor crucial para el desarrollo de la presente tesis: Andrés Tittarelli, Marlene Rozas y Dayan Sanhueza.
- A Loreto Prat, por compartir su investigación y mostrarle a una persona acostumbrada a la investigación digital la importancia de la investigación *in situ*.
- A mi princesa María Luisa Contreras, quien ha estado siempre conmigo, apoyándome, siendo mi cable a tierra... no solo eres una excelente psicóloga, eres una gran mujer.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
1. Objetivos generales	10
2. Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. Material Biológico	11
1.1. Hojas y frutos de frutilla blanca	11
1.2. Hojas y frutos de frutilla roja	12
1.3. Crecimiento de bacterias	12
2. Biología molecular	12
2.1. Secuencias de frutilla blanca	12
2.2. Identificación de putativos genes ortólogos	13
2.3. Diseño de partidores	13
2.4. Análisis de expresión mediante PCR	14

2.5. Análisis de expresión génica con el método de transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	15
2.5.1. Extracción de RNA total de frutos y hoja de frutilla blanca y frutilla roja	15
2.5.2. Cuantificación y análisis de calidad de RNA total de frutos y hoja	16
2.5.3. Tratamiento con DNAsa	17
2.5.4. Reacciones de transcripción reversa (RT) para los RNAs de frutilla	17
2.6. Análisis de expresión cuantitativa mediante reacción de PCR en tiempo real (qPCR)	18
2.7. Minipreparaciones de DNA plasmidial para chequeo de bacterias transformantes	19
2.8. Midipreps de DNA plasmidial para secuenciación	19
2.9. Electroforesis en geles de agarosa para análisis de DNA	19
2.10. Digestión con endonucleasas de restricción	20
2.11. Identificación de extremos 5' y 3' de la enzima Hidroperóxido Liasa mediante reacción RACE (Amplificación rápida de extremos de cDNA)	20
2.11.1. Diseño del experimento	20
2.11.2. Reacción RACE	21
2.11.3. Clonamiento de los fragmentos obtenidos en la reacción de RACE	21
2.12. Herramientas informáticas utilizadas	21
3. Ensayos enzimáticos	21
3.1. Extracción de proteínas de frutilla roja y frutilla blanca	21
3.2. Ensayo enzimático de actividad LOX	22
RESULTADOS	23
1. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA desde fruto y hoja de frutilla	23

2. Análisis relacionados con la ruta de biosíntesis del compuesto	
E2-Z6-nonadienol (NDE)	26
2.1. Búsqueda bioinformática de genes ortólogos	26
2.2. Amplificación de genes	30
2.3. Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real para LOX y HPL	32
2.4. Ensayo enzimático para LOX	35
2.5. RACE de HPL	36
3. Análisis relacionados con la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico	37
3.1. Búsqueda bioinformática de genes ortólogos	37
3.2. Normalización de cDNA	43
3.3. Amplificación de genes con normalización de cDNA	44
4. Confirmación de amplicones mediante secuenciación	46
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de RNA total de fruto (cuatro estadios de desarrollo) y hoja extraído desde frutilla roja y frutilla blanca.....	24
Tabla 2. Resumen de las características de los genes identificados en la ruta metabólica propuesta para la biosíntesis del compuesto nonadienol.....	30
Tabla 3. Resumen de las características de los genes identificados en la ruta metabólica propuesta para la biosíntesis del compuesto ácido cinámico y sus compuestos derivados en frutilla blanca.....	42
Tabla 4. Resumen de los resultados de alineamiento BlastN de los fragmentos amplificados por PCR contra el gen respectivo.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación entre distintos estadios de desarrollo del fruto de frutilla blanca y frutilla roja.....	3
Figura 2. Modelo de la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos a partir del ácido linolénico basado en Baldwin y col (2000) y Buescher y col (2001).....	7
Figura 3. Modelo de la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico.....	9
Figura 4. Distintas etapas (estadios) de desarrollo del fruto de frutilla blanca.....	11
Figura 5. Electroforesis en gel denaturante de RNA total de fruto (cuatro estadios de desarrollo) y hoja extraído desde frutilla roja y frutilla blanca.....	24
Figura 6: Síntesis de cDNA de frutos de frutilla roja y frutilla blanca en diferentes estadios de desarrollo.....	25

Figura 7. Modelo de la ruta de biosíntesis de nonadienol basada en Baldwin y col (2000) y Buescher y col (2001)	26
Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencia aminoacídica entre LOX2 de <i>F. chiloensis</i> (FcLOX2), <i>V. vinifera</i> (VvLOX) y <i>Populus deltoides</i> (PpCCD1a y PpCCD1b)	27
Figura 9. Representación esquemática del gen para la enzima Lipoxigenasa C9 de frutilla blanca (Contig 1106, FcLOX2)	27
Figura 10. Representación esquemática del gen para la enzima HPL de <i>F. vesca</i>	29
Figura 11. Representación esquemática del gen para la enzima Alcohol Deshidrogenasa de frutilla blanca (Contig 1106)	29
Figura 12. Expresión de genes que participan en la ruta de síntesis del compuesto nonadienol	32
Figura 13. Expresión relativa del gen codificante para la enzima LOX en cada estadio de desarrollo y en hoja analizada por PCR en tiempo real	34
Figura 14. Expresión relativa del gen codificante para la enzima HPL en cada estadio de desarrollo y en hoja analizada por PCR en tiempo real	34
Figura 15. Cambios en la actividad enzimática de LOX en extractos crudos de proteína	36
Figura 16. Ensamble de secuencias de HPL de frutilla blanca	47
Figura 17. Modelo de la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico	38
Figura 18. Ensamble de secuencias de FcPAL1 de frutilla blanca	39
Figura 19. Ensamble de secuencias de FcPAL2 de frutilla blanca	40
Figura 20. Representación esquemática del gen FcPAL1 de frutilla blanca	40

Figura 21. Representación esquemática del gen FcCCoL de frutilla blanca	41
Figura 22. Representación esquemática del gen FcGT de frutilla blanca	41
Figura 23. Amplificación del gen 18S de frutilla blanca (Fc18S, fragmento de 256pb) utilizando cDNA normalizado	44
Figura 24. Amplificación de genes que participan en la ruta de síntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico utilizando cDNA normalizado	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAT:** Alcohol Acil Transferasa
- ADH:** Alcohol Deshidrogenasa
- CCoL:** Cinamoil CoA Ligasa
- CTAB:** Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
- DEPC:** Dietileno Policarbonato
- GapDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- GT:** Glucosil Transferasa
- HPL:** Hidroperóxido Liasa
- IAA:** Alcohol Isoamilico
- LOX:** Lipoxigenasa
- MLA:** Marco de Lectura Abierto
- MOPS:** Acido Morfolino Propano Sulfónico
- NDE:** E-2-Z-6-Nonadienol
- PAL:** Fenilalanina Amonio Liasa
- PVP:** Polivinil Pirrolidona
- MIFAB:** Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada



RESUMEN

La frutilla blanca (*Fragaria chiloensis*) es una planta nativa de Chile que presenta características organolépticas diferentes a la frutilla roja comercial (*Fragaria x ananassa*). Estos atributos le confieren una originalidad que podría utilizarse para ofrecerla al mercado como una fruta exótica. En la presente tesis se identificaron y analizaron dos rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de dos compuestos aromáticos de frutilla blanca. Estos compuestos presentan características aromáticas que diferencian a la frutilla blanca de la frutilla comercial. Uno de estos compuestos es el E-2-Z-6-nonadienol que es detectado sólo en frutilla blanca y el otro compuesto es el ácido cinámico que es detectado en una concentración 24 veces mayor respecto a frutilla roja. Mediante análisis de homología de secuencias fue posible identificar genes ortólogos en frutilla blanca que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos. A partir de ello se estudió la expresión de los principales genes de ambas rutas. Se observó una mayor expresión relativa de la enzima Lipoxigenasa (LOX) e Hidroperóxido Liasa (HPL) en frutilla blanca respecto de frutilla roja. Este resultado podría ser la primera evidencia molecular que da cuenta de la diferencia en la detección del compuesto nonadienol entre ambas especies. Respecto al ácido cinámico, se proponen dos rutas paralelas de biosíntesis para los compuestos derivados, etil y metil esteres de cinamato, en frutilla blanca. En ambas vías fue posible estudiar la expresión de genes ortólogos identificados en frutilla blanca y no se observó diferencia en el perfil de expresión de los genes de ambas vías. Este resultado, junto a los obtenidos en otros trabajos en frutilla roja, nos permite proponer que la transformación del ácido cinámico ocurre indistintamente por cualquiera de las

ABSTRACT

White strawberry (*Fragaria chiloensis*) is a native plant from Chile that presents different organoleptics characteristics compared to the commercial red strawberry (*Fragaria x ananassa*). These original characteristics might allow that the white strawberry can be offered as an exotic fruit. In the present thesis were identified and analyzed two metabolic pathways in white strawberry that participates in the biosynthesis of two aromatic compounds. These compounds have interesting aromatic features that make the white strawberry different from the commercial one. One of these compounds is E-2-Z-6-nonadienol that is detected only in the white strawberry and the second one is cinnamic acid that is detected in a concentration 24 fold higher than in red strawberry. Using homology sequence analyses, it was possible to identify ortholog genes in white strawberry for the enzymes involved in the biosynthesis of these compounds. Then was possible, to study the expression of the major genes for both pathways. It was found a higher relative expression of the gene that codes for the enzyme Lipoxigenase (LOX) and Hydroperoxide Lyase (HPL) in white strawberry compared to red strawberry. This could be the first molecular evidence for the explanation of the differences found in the detection of nonadienol for both species. Regarding cinnamic acid, in white strawberry two parallel pathways are proposed for the biosynthesis of the derived compounds, ethyl and methyl cinnamate. In both pathways it was possible to study the expression of the orthologs genes identified in white strawberry showing no difference from the expression profile of the genes. This result, along with the ones obtained in other studies using red strawberry allow us to propose that the transformation of cinnamic acid occur interchangeably by either route in both species, which amplifies the

synthesis of this type of compounds. It was also found a difference in the expression profile of the enzyme PAL isoform 1 between both species. Because this enzyme is the direct responsible of the cinnamic acid synthesis from phenylalanine, this difference in the expression profile, can be the direct cause of the high difference found in the compound detection between both species. Taking in consideration these results, we propose for future investigations to observe if exists disparity in the substrate availability and/or in the enzymatic activity between both species.

In this Thesis were identified different genes involved in the synthesis pathway of aromatic compounds in white strawberry and its nucleotide sequences. Also their expression profiles were studied during fruit development in both species of strawberry. These results serve as a basis for further works to differentiate and characterize the fruit features of *Fragaria chiloensis*, our white strawberry.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la frutilla roja (*Fragaria x ananassa*) ocupa un lugar importante en la industria frutícola a nivel mundial. Diferentes cualidades como sus características organolépticas, sus propiedades dietéticas, su acción antioxidante (Stewart y col, 2004) y su versatilidad para ser consumida en diferentes formas, han impulsado un fuerte incremento en su consumo en todo el mundo. La producción mundial ha aumentado desde 1,8 millones de toneladas en el año 1980 a 3,6 millones de toneladas en el año 2007, encontrándose dentro de las diez especies frutales de mayor consumo (Base de Datos Estadística FAO, FAOSTAT versión 2009; <http://faostat.fao.org>). En Chile, el cultivo de la frutilla roja ocupa una superficie aproximada de 4.600 hectáreas que permiten una producción de 44.669 toneladas métricas cuyo destino es satisfacer la demanda local y la exportación como fruta congelada.

La frutilla roja comercial, es el resultado de la hibridación entre dos especies octoploides: *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*, esta última, recolectada en el sur de Chile por el navegante francés A.F. Frezier en el año 1714 (Darrow, 1966; Wilhelm & Sagen, 1974). El germoplasma de la frutilla chilena, comúnmente denominada frutilla blanca, es un importante recurso genético, a partir del cual se han incorporado en las variedades modernas diversas características agronómicas favorables, especialmente de sabor y aroma (Hancock, 1999). Presenta una pequeña superficie cultivada en Chile, concentrando su producción en 2 localidades: la zona de Curepto (VII región) y de Contulmo (VIII región), aunque es capaz de crecer bajo una gran variedad de climas y suelos (Lavín y col, 2000; Becerra y col, 2001).

En cuanto a las características comerciales, el fruto de frutilla roja es cultivado debido a sus cualidades organolépticas que le confieren un sabor, una textura y un aroma muy apreciado por los consumidores (Bood & Zabetakis, 2002). Su aroma ha sido extensivamente investigado durante los últimos 50 años y hasta ahora se han identificado en esta especie más de 360 compuestos aromáticos (Pérez y col, 1992; Schieberle, 1994). Basados en el valor del aroma y en el factor de dilución, sólo una pequeña cantidad de esos 360 compuestos volátiles identificados han sido considerados relevantes en la percepción del aroma (Pyysalo y col, 1979; Larsen & Poll, 1992; Schieberle & Hoffmann, 1997; Zabetakis & Holden, 1997). Por otra parte, la abundancia relativa de volátiles individuales son una huella digital de un cultivar y en particular de la especie. Es por esto que la relación entre los volátiles que impactan en el aroma y variedades de frutilla ha sido tema de estudio de numerosas investigaciones (Douillard & Guichard, 1990; Larsen & Poll, 1992). En cambio, la frutilla blanca es una especie promisoría comercialmente debido a que posee características organolépticas muy diferentes a la de la frutilla tradicional, atributos que le confieren una originalidad que podría utilizarse para ofrecer al mercado una fruta exótica. Estudios sensoriales realizados por Adasme y col (2006) concluyen que hay preferencia por la frutilla blanca sobre la roja, resaltando principalmente el sabor y el dulzor. También destacan la diferencia más evidente entre frutilla blanca y frutilla roja que es precisamente su coloración en los distintos estadios de desarrollo del fruto, tal como se observa en la Figura 1.



Figura 1: Comparación entre distintos estadios de desarrollo del fruto de frutilla blanca y frutilla roja. Se presentan ordenados desde menor a mayor estadio de desarrollo.

Lamentablemente, la frutilla blanca no se ha posicionado en el mercado pues presenta problemas asociados a su manejo, maduración y post-cosecha ya que se deteriora rápidamente (Adasme y col, 2006).

Uno de los atributos destacados de esta especie es su aroma, cualidad que podría ser utilizada como una característica de selección en un programa de mejoramiento genético tanto de la frutilla roja, como de otras especies comerciales; sin embargo, el aroma es un carácter complejo para seleccionar, ya que muchos compuestos volátiles liberados en alta concentración por las frutas son percibidos escasamente por los humanos (Lewinsohn y col, 2001). Por otro lado la frutilla es un fruto no climatérico, debido a que no incrementa su respiración ni la producción de etileno una vez que se ha cosechado, por lo tanto, solo es posible percibir algunos compuestos aromáticos durante la madurez de consumo, lo que dificulta aún más la selección de estos caracteres o compuestos aromáticos (Abeles & Takeda, 1990).

En general, los compuestos aromáticos incluyen una variada selección de estructuras químicas como ésteres, aldehídos, ácidos alifáticos, alcoholes, lactosas, terpenos,

compuestos fenólicos volátiles, furanonas y compuestos sulfurados (Tressl y col, 1975; Sanz y col, 1997). Además, la contribución individual de un compuesto aromático al aroma total de la fruta depende, entre otros factores, de su concentración y del valor umbral, que es la cantidad mínima de compuesto aromático que puede ser detectado y reconocido por el 75% de un panel sensorial entrenado (Noble, 1988).

Estos compuestos son sintetizados principalmente en asociación a las rutas bioquímicas de ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos (Sanz y col, 1997):

- Los ácidos grasos son uno de los mayores precursores de compuestos volátiles responsables del aroma en la mayoría de las plantas. En general, son catalizados a través de 2 vías oxidativas principales, la β -oxidación y la ruta de las lipoxigenasas (LOX). Además, es posible distinguir entre aromas primarios, que son generados por la fruta o vegetal intacto a través del movimiento intracelular de compuestos volátiles, y aromas secundarios, que son generados por rompimiento de la integridad celular y/o por corte o aplastamiento durante el proceso de masticación de la fruta. Se ha sugerido que la β -oxidación es la principal ruta metabólica que produce aromas primarios en la fruta, mientras que la ruta de LOX puede producir aromas secundarios por ruptura mecánica (Sanz y col, 1997).

- Los aminoácidos pueden ser precursores directos de algunos aromas, lo que ha sido observado en frutas, ó pueden ser precursores indirectos, transformándose en sustratos para enzimas que generan aromas, principalmente en hortalizas (Sanz y col, 1997). Cuando actúan como precursores pueden contribuir al aroma primario, liberándose directamente en la madurez de la fruta, tal como alanina, valina, leucina, fenilalanina o ácido aspártico encontrados en plátanos (Myers y col, 1970) y tomates (Yu y col, 1968).

- Los carbohidratos son precursores de un bajo número de compuestos aromáticos en plantas. Los terpenos son producidos por la ruta metabólica de los isoprenoides biosintetizados a partir de carbohidratos o lípidos, mientras que las furanonas son producidas por intermediarios del ciclo de las fosfato pentosas (Sanz y col, 1997).

De esta forma, existe una gran variedad de fuentes para la biosíntesis de compuestos aromáticos en los procesos celulares incluyendo los procesos de degradación, por lo cual el origen de un aroma estará directamente ligado a la identidad de los principales compuestos detectados en una condición determinada.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio han identificado los principales compuestos volátiles con impacto olfativo que están presentes sólo en frutilla blanca y no en frutilla roja en estadíos de maduración del fruto (Prat y col, datos no publicados). Dentro de estos compuestos característicos de frutilla blanca se identificó el 3-oxo- α -ionol que proviene del metabolismo de carbohidratos y el E-2-Z-6-nonadienol que proviene del metabolismo de ácidos grasos. Los descriptores aromáticos para estos compuestos fueron de un aroma cítrico-floral para el 3-oxo- α -ionol y un aroma a licor dulce y nuez para el nonadienol. Estos compuestos contribuyen al aroma característico de frutilla blanca, por lo cual es interesante estudiar los posibles genes involucrados en su ruta de biosíntesis, y la regulación en la emisión de estos compuestos en los distintos estadíos de madurez de la fruta. La presente tesis está enfocada principalmente en estudiar la ruta de biosíntesis del compuesto nonadienol en frutilla blanca.

Estructuralmente el compuesto nonadienol es un alcohol alifático no saturado presente en distintas configuraciones estéricas. La configuración identificada en frutilla blanca

corresponde al E-2-Z-6-nonadienol (NDE). Este compuesto fue detectado solo en los perfiles obtenidos para frutilla blanca y es el principal responsable del aroma dulce y fresco del pepino (Buescher y col, 2001). También ha sido identificado en otras especies vegetales como por ejemplo tomate (Baldwin y col, 2000).

Se conoce que en plantas es sintetizado enzimáticamente desde ácido linolénico (un ácido graso poli-insaturado) por una secuencia de reacciones que involucra la acción de cuatro enzimas: Lipoxigenasa (LOX), Hidroxiperóxido Liasa (HPL), Isomerasas y Alcohol Deshidrogenasa (ADH) (Heiler & Schieberle, 1997; Buescher y col, 2001).

Respecto a la ruta de biosíntesis, el primer paso es la hidroperoxidación selectiva sobre un carbono del ácido linolénico, lo cual diferencia dos tipos de Lipoxigenasas (Galliard y col, 2001):

- Lipoxigenasa C13: Hidroperoxida el carbono 13 del ácido linolénico lo cual deriva, al final de la ruta, en la producción de compuestos volátiles de 5 y 6 carbonos. La enzima representante de este grupo es la LOX de soya.
- Lipoxigenasa C9: Hidroperoxida el carbono 9 del ácido linolénico, dirigiendo la ruta de biosíntesis hacia la producción final de un compuesto volátil de 9 carbonos, el nonadienol. La enzima representante de este grupo es la LOX de papa.

De esta forma, para la biosíntesis del compuesto nonadienol es necesario identificar una enzima Lipoxigenasa tipo C9.

Según el modelo descrito para la biosíntesis de compuestos aromáticos a partir del ácido linolénico (Figura 2), se ha propuesto la existencia de una enzima isomerasa responsable de la transformación E-Z-nonadienal a Z-E-nonadienal (Grechkin, 1998; Noordermeer y col, 1999), pero no existe evidencia asociada a una enzima específica en alguna especie vegetal; en cambio, otros autores proponen que la enzima HPL es la

responsable tanto de la actividad liasa como de la actividad isomerasa (Kuroda y col, 2005). De esta forma, la enzima HPL tendría el rol principal dentro de la ruta de biosíntesis del nonadienol.

Es importante destacar que hasta ahora no existe ninguna publicación asociada a un gen codificante para HPL dentro de la familia Rosaceae.

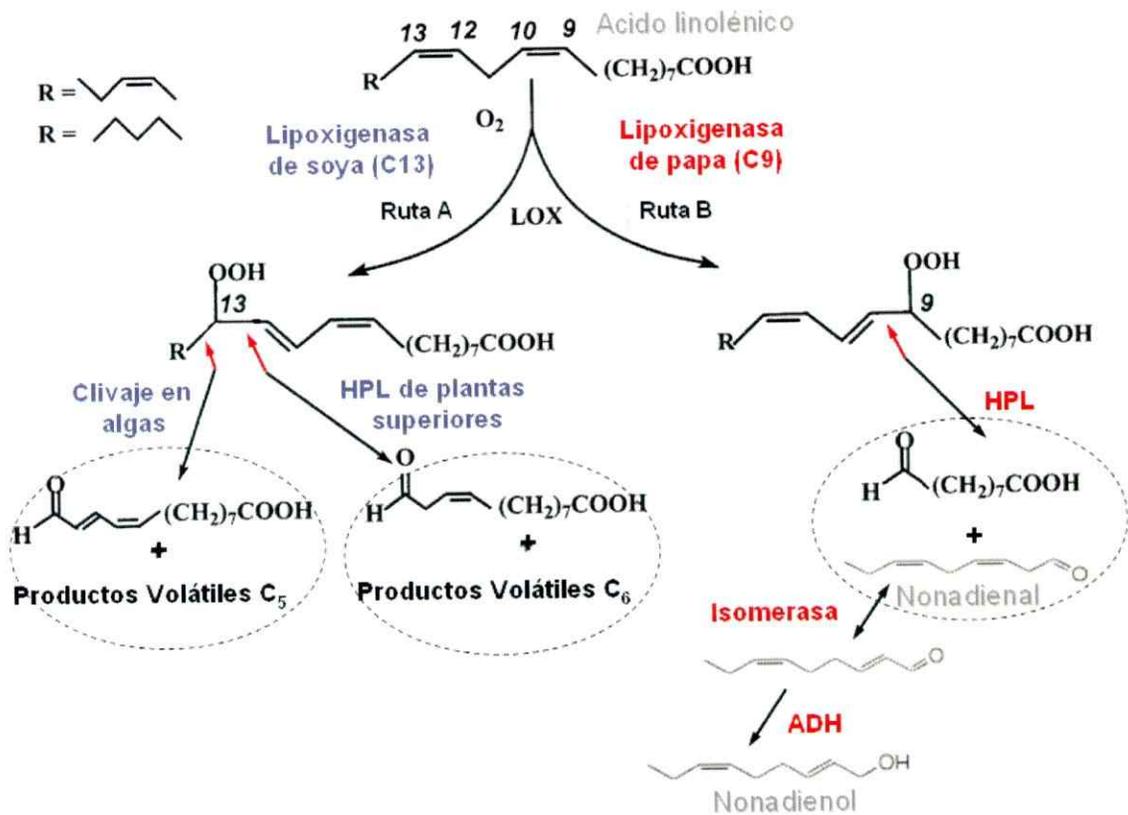


Figura 2: Modelo de la ruta de biosíntesis de compuestos aromáticos a partir del ácido linolénico basado en Baldwin y col (2000) y Buescher y col (2001). Se representan en rojo las enzimas que permiten la obtención de nonadienol, mientras que en azul están las enzimas que producen otros compuestos aromáticos. Con flechas rojas se indica el enlace que es interrumpido por la acción de la enzima HPL. Las circunferencias muestran los productos obtenidos a partir de la acción de la enzima HPL respectiva. HPL=Hidroperóxido Liasa. ADH=Alcohol Deshidrogenasa.

Otro compuesto interesante en el perfil aromático de frutilla blanca es el ácido cinámico pues presenta una concentración relativa 24 veces mayor que la observada en frutilla roja (Prat y col, datos no publicados). Los descriptores aromáticos para este

compuesto son aroma a canela, floral, especias y miel (tonos dulces) (Budavari, 2001). Este compuesto, junto con sus derivados metil, etil y bencil esteres de cinamato, son los principales componentes del aceite esencial de canela. Estos derivados son compuestos de aromas intensos que han sido usados recurrentemente en la industria cosmética y también alimenticia. Considerando lo anterior, el segundo objetivo del presente trabajo es identificar la ruta de biosíntesis del ácido cinámico y sus compuestos derivados en frutilla blanca.

El ácido cinámico es parte de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides y su síntesis es realizada por la acción directa de la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) sobre el aminoácido fenilalanina (Lunkenbein y col, 2006a). Respecto a la biosíntesis de derivados metil y etil eteres de cinamato, existen dos rutas propuestas en frutilla roja (Figura 3). Aharoni y col (2000) identificaron, mediante el uso de microarreglos de DNA, una enzima Alcohol Acil Transferasa (AAT) cuya actividad está fuertemente asociada a la utilización de moléculas acil-CoA y alcoholes para formar esteres aromáticos, entre ellos los esteres de cinamato. Para ello es necesaria la enzima Cinamoil CoA Ligasa (CCoL) que transforma el ácido cinámico en el intermediario cinamoil-CoA. Por otro lado, Lunkenbein y col (2006b) observaron que el fruto de frutilla roja acumula esteres hidroxí-cinamoil glucosa que pueden servir como precursores de diversos metabolitos secundarios tales como metil y etil cinamatos constituyentes del aroma del fruto. Estos autores comprobaron que la acción de la enzima UDP-glucosa:cinamato Glucosil Transferasa (GT) cataliza la formación de cinamoil glucosa y p-coumaroil glucosa durante la maduración del fruto, lo cual se correlaciona con el aumento de metil y etil esteres cinamatos. Sin embargo, no

lograron describir una enzima que hiciera la transformación final desde el intermediario β -glucosidado hasta los productos derivados.

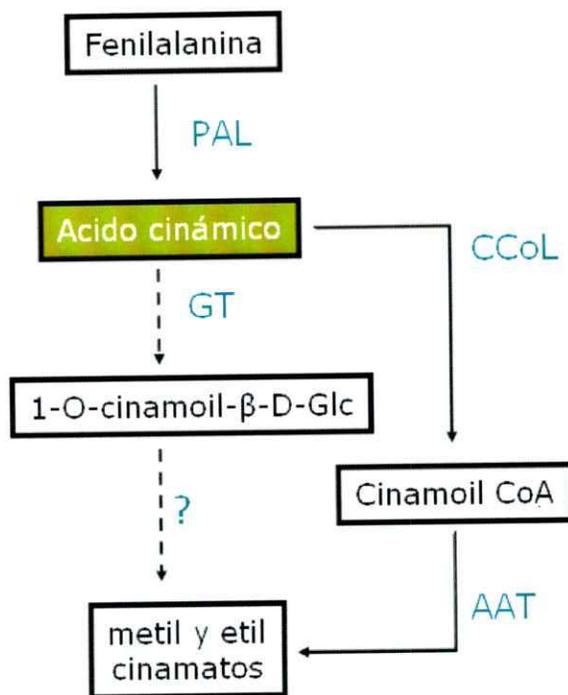


Figura 3: Modelo de la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico. La ruta con línea segmentada está basada en Lunkenbein y col (2006b) y la ruta con línea continua en Aharoni y col (2000). En verde se destaca el compuesto detectado en frutilla blanca. PAL=Fenilalanina Amonio Liasa. GT=Glucosil Transferasa. CCoL=Cinamoil Coa Ligasa. AAT=Alcohol Acil Transferasa.

En base a los antecedentes descritos, el objetivo general de la presente tesis es encontrar genes involucrados en la biosíntesis de compuestos volátiles identificados en frutilla blanca. Estos compuestos deben poseer propiedades aromáticas interesantes desde un punto de vista organoléptico, de forma similar a lo realizado en otras especies frutales (Lewinshon y col, 2001; Lunkenbein y col, 2006a; Raab y col, 2006; Wyllie y col, 1996). En particular, el objetivo es estudiar las rutas relacionadas con la biosíntesis de los compuestos aromáticos nonadienol y ácido cinámico.

1.1. Objetivos Generales

- Relacionar los compuestos aromáticos nonadienol y ácido cinámico (identificados en el análisis de compuestos volátiles de frutilla blanca) con rutas metabólicas descritas en otras especies de plantas.
- Determinar la existencia de genes ortólogos y su patrón de expresión durante el desarrollo del fruto de frutilla blanca para cada una de las enzimas descritas en la biosíntesis de los compuestos volátiles identificados.

1.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la expresión de los genes codificantes para las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis del compuesto nonadienol en frutilla blanca durante los distintos estadios de desarrollo del fruto mediante RT-PCR y qPCR.
- Determinar la presencia de un gen ortólogo a la enzima HPL.
- Estudiar la expresión de los genes codificantes para las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis del compuesto ácido cinámico y sus derivados etil y metil esteres de cinamato, en frutilla blanca en los distintos estadios de desarrollo del fruto mediante RT-PCR.
- Establecer si existe alguna preferencia a nivel de expresión de genes entre las dos rutas metabólicas propuestas para la biosíntesis del compuesto ácido cinámico y sus derivados etil y metil esteres de cinamato en frutilla blanca.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material Biológico.

1.1.- Hojas y frutos de frutilla blanca.

Se utilizaron frutos congelados (-80°C) de *F. chilensis* spp. *chiloensis*. Estos frutos fueron cosechados previamente al desarrollo de la presente tesis por Loreto Prat (datos no mostrados) desde plantas de dos años de edad provenientes de la localidad de Contulmo, Chile (38°0'58"S 73°13'43"W) en enero del año 2008.

Para la extracción de RNA total y proteínas totales se usaron frutos según los siguientes estadios de desarrollo: S1=tamaño pequeño y verde, S2=tamaño mediano y verde, S3=tamaño grande y cambiando de color a blanco y S4=completamente maduro y de color rosado claro. (Figura 4). Varios frutos de diferentes plantas fueron mezclados generando un pool representativo para cada estadio. También se utilizaron hojas congeladas (-80°C) recolectadas en el mismo período antes mencionado.

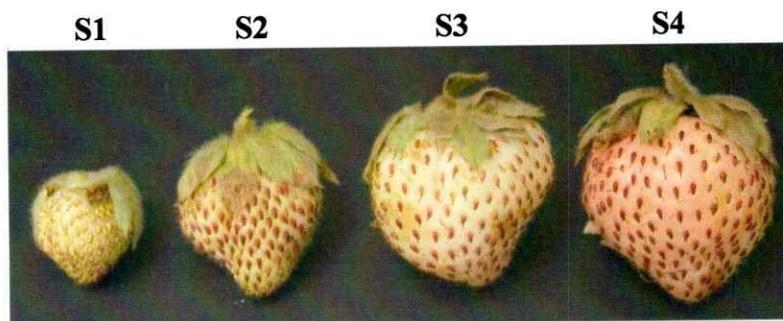


Figura 4: Distintas etapas (estadios) de desarrollo del fruto de frutilla blanca. S1=tamaño pequeño y verde. S2=tamaño mediano y verde. S3=tamaño grande y cambiando de color a blanco. S4=completamente maduro y de color rosado claro.

1.2.- Hojas y frutos de frutilla roja.

Se utilizaron frutos congelados (-80°C) de *F. x ananassa* variedad Camarosa, los cuales fueron cosechados previamente al desarrollo de esta tesis por Loreto Prat (datos no mostrados) desde un cultivo experimental en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile (Campus Antumapu).

1.3.- Crecimiento de bacterias.

La bacteria *Escherichia coli* cepa DH5 α fue crecida en medio LB líquido estéril (1% triptona; 0,5% extracto de levadura; 1% NaCl) y en LB sólido estéril (1,5% agar). Las incubaciones fueron hechas a 37°C por 16 horas, y cuando se trató de medio líquido la velocidad de agitación fue de 250 rpm. El antibiótico de selección utilizado en este trabajo fue Ampicilina (100 μ g/ml), ya que los vectores utilizados poseían el gen que codifica para la enzima β -lactamasa, la cual confiere resistencia a este antibiótico.

2.- Biología molecular.

2.1.- Secuencias de frutilla blanca.

En esta tesis se trabajó con secuencias de ESTs y Unigenes provenientes de una genoteca de cDNA generada a partir de RNA de mesocarpo de frutos de frutilla blanca en estadio de desarrollo S3 y S4. Estos estadios corresponden al estado de cosecha y consumo, que además, es el momento en el cual la fruta presenta una alta emisión de compuestos aromáticos. La genoteca fue construida por el Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB) quienes nos facilitaron el acceso a 9.985 secuencias de ESTs y 5.417 unigenes con su respectiva anotación (Pablo

Valenzuela, no publicado). El protocolo que utilizó MIFAB para la obtención, secuenciación y análisis de los ESTs es igual al utilizado por Silva y col, 2005.

Con el fin de hacer compatible esta información con nuestra plataforma interna de análisis de secuencias (JUICE, Latorre y col, 2006) se realizó un nuevo ensamble de los ESTs (MIFAB) , siguiendo el protocolo descrito por Vizoso y col (2009).

2.2.- Identificación de putativos genes ortólogos.

Para la búsqueda de genes de frutilla blanca relacionados con rutas metabólicas involucradas en la síntesis de compuestos aromáticos, se realizaron alineamientos BlastX (Altschul y col, 1997), BlastN y TblastN (Altschul y col, 1990). Se trabajo en base a la plataforma online de MIFAB para visualización de secuencias y, en caso de análisis masivos, se utilizó la plataforma computacional interna de nuestro laboratorio, la cual permite realizar análisis múltiples mediante protocolos clusterizados de Blast y optimización de los informes obtenidos para una fácil visualización de resultados (Latorre y col, 2006).

2.3.- Diseño de partidores.

La mayoría de los partidores utilizados en esta tesis fueron diseñados manualmente mediante inspección visual de la secuencia blanco, o con la ayuda del conjunto de programas de la Suite Vector NTI Advance versión 11 (<http://www.invitrogen.com>) y confirmados mediante análisis en el software Primer Premiere versión 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com>).

Los partidores diseñados en esta investigación fueron los siguientes:

partidor directo LOX2aF : 5' ATTGAACTCACTCGACCACC 3'

partidor reverso LOX2a2R : 5' GTCTCAATGATTCCACCTGC 3'

partidor directo FvHPL1aF : 5' CCAGTTCCTCTCCAATTCGC 3'
partidor reverso FvHPL1aR : 5' GCGCACTGTTTGTGGAGG 3'
partidor directo FvHPL1-rcF : 5' TCACCCAGCACCTCAAACAAAC 3'
partidor reverso FvHPL1-rcR : 5' GAGTCGTGCGAACTGAGTTGGAAGT 3'
partidor directo FcADH1aF : 5' TTAGGTCATGAAGCTGGAGG 3'
partidor reverso FcADH1R2 : 5' TCTTGGCTTCCTCAAATCGG 3'
partidor directo FcPAL1aF : 5' CATGGTGGAACTTCCAAGG 3'
partidor reverso FcPAL1aR : 5' TGCCTGAGATCAACAGCTTG 3'
partidor directo FcCCLRT1-F : 5' ATCAGGCCGAATCAGACAA 3'
partidor reverso FcCCLRT1-R : 5' TGAGGAGGACGATTGGAAG 3'
partidor directo FcGAT2RT-F : 5' CATCGGCCAAGGCCATGTG 3'
partidor reverso FcGAT2RT-R : 5' GTGATGCCGTTGGACTTGCG 3'
partidor directo FcGapDH-F : 5' TCCATTCATCACCACCGACTA 3'
partidor reverso FcGapDH-R : 5' ACCTTCTTGGCACCTCCCT 3'
partidor directo Fc18S-F : 5' GGATCATTGTCGAAACCTGC 3'
partidor reverso Fc18S-R : 5' ATACTGAAGACGACGAACCG 3'

2.4.- Análisis de expresión mediante PCR.

La mayoría de las amplificaciones mediante PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 µl que contenía: 1 µl de cDNA; buffer 1X; dNTPs 0,1 µM; partidores 0,2 µM; Taq 1,25 U; agua destilada hasta completar 25 µl. El programa de PCR utilizado fue: 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, temperatura de fusión promedio de ambos partidores (T_m) menos 5°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, repetir desde paso 2 por 35 ciclos y finalmente 72°C por 10 minutos. En casos particulares, como el uso de

enzimas con actividad correctora (Platinum *Taq* DNA polimerasa, Invitrogen; Easy-A DNA polimerasa, Stratagene), se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante.

2.5.- Análisis de expresión génica con el método de transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

2.5.1.- Extracción de RNA total de frutos y hoja de frutilla blanca y frutilla roja.

El método de extracción de RNA total está basado en Jaakola y col (2001) el cual es un protocolo modificado de Chang y col (1993). Se molió el tejido congelado (fruta/hoja) añadiendo constantemente nitrógeno líquido en mortero pre-enfriado a -20°C por dos horas. Luego se agregó 2 gr de tejido molido a un tubo corex de 30 ml mantenido en hielo todo el tiempo y se agregó 10 ml de buffer de extracción precalentado a 65°C (2% p/v CTAB; 2% p/v PVP (PM 40.000); 100 mM Tris-HCL (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl) y 200 µl de 2-mercaptoetanol y se mezcló 1 vez mediante vortex para luego incubar la mezcla por 10 minutos a 65°C. Enseguida se centrifugó la mezcla a 9.000 rpm por 35 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Éste fue extraído 2 veces con 1 volumen de cloroformo/IAA (24:1) agitando en vortex por 3 minutos. Las fases fueron separadas a 9.000 rpm por 15 minutos a 4°C (se recupera la fase acuosa). La fase acuosa se mezcló suavemente con 1/4 de volumen de cloruro de litio y se dejó precipitando toda la noche a 4°C en hielo. Al otro día la muestra fue centrifugada a 9.000 rpm por 35 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 10 ml de etanol 70% frío, centrifugando a 9.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se disolvió el precipitado con 500 µl de buffer SSTE (1 M NaCl; 0,5% SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)). En caso que el buffer SSTE hubiera precipitado luego de

estar almacenado a 4°C, fue necesario disolverlo calentando a 30°C antes de su utilización. La muestra fue traspasada a tubo eppendorf y extraída una vez con 1 volumen de fenol/cloroformo/IAA (25:24:1) y una vez con cloroformo/IAA (24:1) centrifugando a 12.000 rpm por 10 minutos. Se agregó 2 volúmenes de etanol al 100% frío al sobrenadante y se dejó precipitar por 2 horas a -20°C o 30 minutos a -80°C. A continuación la muestra fue centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 200 µl de etanol 70%, centrifugando a 12.000 rpm por 10 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet en 40 µl de agua DEPC.

2.5.2.- Cuantificación y análisis de calidad de RNA total de frutos y hoja de frutilla.

La concentración de RNA total fue determinada en base a la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpec, SHIMADZU). Las muestras de RNA fueron diluidas 60 veces en agua DEPC y la concentración se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{ssRNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 0,04 \times 60 \text{ (ecuación 1)}$$

La pureza del RNA se determinó haciendo una relación A260/A280 que debe estar entre 1,8-2,0 para asegurar que no existe contaminación con proteínas, y una relación A260/A240 que debe ser sobre 1,0 para asegurar que no existe contaminación con polisacáridos/polifenoles (Meisel y col, 2005). La integridad del RNA total fue analizada en un gel al 1,5% de agarosa, el cual fue preparado con MOPS 1X y formaldehído al 1,1%. La muestra de RNA se mezcló con formamida, formaldehído y MOPS, y fue denaturada a 70°C durante 10 minutos. Previo a cargar la muestra en el gel se agregó buffer de corrida (1:1 de azul de bromofenol (1%) y Bromuro de etidio (1mg/ml). El gel

se corrió en una cámara con MOPS 1X, con una diferencia de potencial de 100V durante 30 minutos. La visualización se llevó a cabo con luz UV, teniendo en consideración que en un RNA de buena calidad la banda de rRNA de 28S representa aproximadamente el doble en cantidad con respecto a la banda de rRNA de 18S.

2.5.3.- Tratamiento con DNAsa.

Se preparó una mezcla que contiene 4 µg de RNA, 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa (RiboLock, Fermentas), 2 µl de DNAsa (Fermentas), 2 µl de buffer DNAsa y agua DEPC hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla fue incubada a 37°C por 1 hora, luego se agregó 2 µl de Oligo(dT)¹⁵ (25 ng/µl) y se incubó a 72°C por 15 minutos.

2.5.4.- Reacciones de transcripción reversa (RT) para los RNAs de frutilla.

Las reacciones de transcripción reversa fueron realizadas usando el sistema ImProm-II TM Reverse Transcription System de Promega (N° cat. A3800). Para cada reacción se usó 6 µl de la muestra post tratamiento con Oligo(dT)¹⁵ (ver paso 2.5.3), en un volumen final de reacción de 20 µl. Esta mezcla de reacción contiene: 6 µl de muestra; 0,05 pg de RNA que codifica para el gen de resistencia a Kanamicina (1,2 kb) que es utilizado como control positivo para la reacción; 1X de buffer ImProm-II TM; 5 mM de MgCl₂; 0,5 mM de mezcla de dNTPs; 20 U de Inhibidor de ribonucleasa recombinante RNasin, 1 µl de Transcriptasa reversa ImPromII TM y agua DEPC hasta completar 20 µl. Paralelamente se realizaron reacciones donde están todos los componentes de la mezcla a excepción de la Transcriptasa Reversa, que servirán como control negativo para las reacciones de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador estándar, usando un programa de incubación a 25°C durante 5 minutos para permitir el alineamiento de los partidores Oligo(dT), seguido de una incubación a 42°C por 4

horas que permite la extensión de la hebra de cDNA y finalmente incubar a 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

2.6.- Análisis de expresión cuantitativa mediante reacción de PCR en tiempo real (qPCR).

Las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema "Maxima SYBR Green qPCR Master Mix" (N° cat. KO221, Fermentas) en un equipo Stratagene modelo MX3000P. Se usó un volumen total de reacción de 25 µl que contiene 50 a 200 ng (0,5 µl) de cDNA, 0,3 µM de cada partidor y 12,5 µl de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix.

Las condiciones para la reacción fueron: 95°C durante 10 minutos para activar la enzima, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Al final de cada ciclo se midió la señal de fluorescencia que emite el SYBR Green cuando es intercalado en una doble hebra de DNA, utilizando el canal F1 (530 nm) para realizar dicha medición. Una vez terminados los 40 ciclos, se realizó un paso adicional según las siguientes condiciones: 95°C por 60 segundos, 58°C por 30 segundos y 95°C por 30 segundos. En este paso se midió de forma continua la fluorescencia de SYBR Green (durante la última denaturación) para construir una curva de fusión que permitió determinar si el producto amplificado corresponde al esperado.

Para cada gen en cuestión se construyó una curva estándar, usando como muestra diluciones seriadas (1:1, 1:5, 1:25, 1:125 y 1:625 de cDNA del estadio de desarrollo S3 de frutilla blanca). Con esta curva estándar es posible determinar la eficiencia de amplificación de los partidores usando el software MxPro versión 3.00 (<http://www.stratagene.com/products/displayProduct.aspx?pid=810>).

2.7.- Minipreparaciones de DNA plasmidial para chequeo de bacterias transformantes.

Se sedimentó 2-3 ml del cultivo bacteriano de 16 horas centrifugando a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente para luego resuspender el sedimento en 150 µl de solución 1 (Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM; EDTA (pH 8,0) 10 mM; RNasa 100 µg/ml). Luego se agregó 150 µl de solución 2 (NaOH 0,2 M; SDS 1% p/v) mezclando por inversión y dejando incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la solución 3 (KOAc 2,5 M pH 4,8) mezclando por inversión y la mezcla fue centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. Se traspasaron 440 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf que contiene 1 ml de isopropanol mezclando por inversión y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla fue centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos y se lavó el sedimento mediante vortex con 500 µl de etanol 70% y centrifugando a 14.000 rpm. Se dejó secar el sedimento y fue resuspendido en 50 µl de agua destilada.

2.8.- Midipreps de DNA plasmidial para secuenciación.

Los cultivos de *E.coli* transformadas con el vector pGEM-T (100-150 ml) fueron crecidos en medio LB suplementado con higromicina (50 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). Para la extracción de DNA plasmidial se utilizó el kit Wizard® Plus Midipreps (Promega, N° cat. A7640) según las indicaciones del fabricante..

2.9.- Electroforesis en geles de agarosa para análisis de DNA.

Se prepararon geles de agarosa 1% p/v o 2% p/v con buffer de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) con bromuro de etidio (0,1 mg/ml). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a "1 kb DNA GeneRuler" o "100 bp Plus GeneRuler", ambos de la empresa Fermentas, según la precisión deseada.

Para ser cargadas, las muestras de DNA fueron mezcladas con la cantidad adecuada de buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilen cianol y 30% glicerol). La corrida se realizó con buffer TAE 1X, aplicando una diferencia de potencial de 120V.

2.10.- Digestión con endonucleasas de restricción.

Se usaron 5 a 10 U de enzima para una cantidad de DNA entre 1 y 3 µg. La incubación se llevó a cabo por 2 ó 3 horas en baño termoregulado según la temperatura óptima para la enzima. Los resultados de la digestión se visualizaron en gel de agarosa según protocolo descrito 2.9.

2.11.- Identificación de extremos 5' y 3' de la enzima Hidroperóxido Liasa mediante reacción RACE (Amplificación rápida de extremos de cDNA).

2.11.1.- Diseño del experimento.

Se diseñaron dos pares de partidores en base a la secuencia conocida de HPL en *F. vesca* y *F. chilensis* que fueran compatibles con los partidores del kit RACE para evitar formación de dímeros de partidores durante la reacción. Para amplificar el extremo 5' se utilizó el partidor FvHPL1-rcR (5' GAGTCGTGCGAACTGAGTTGGAAGT 3') y para el extremo 3' se utilizó el partidor FvHPL1-rcF (5' TCACCCAGCACCTCAAACAAAC 3'). El mRNA utilizado fue extraído desde frutos de frutilla blanca en estadio de desarrollo S2 (tamaño mediano y verde) con el método antes mencionado y, purificado utilizando el kit RNeasy MiniElute Cleanup (QIAGEN, N° cat. 74204).

2.11.2.- Reacción RACE.

La reacción de RACE fue efectuada según las instrucciones del kit GeneRacer Superscript TA (Invitrogen) utilizando la polimerasa Platinum Taq Polimerase (Invitrogen) para todos los pasos de amplificación por PCR.

2.11.3.- Clonamiento de los fragmentos obtenidos en la reacción de RACE.

Se realizó según las recomendaciones del kit utilizando el sistema TOPO TA cloning (Invitrogen), complementado con el sistema de transformación One Shot TOP10 Competent Cells (Invitrogen).

2.12.- Herramientas Informáticas utilizadas.

Para administrar, procesar y graficar todas las secuencias utilizadas en la presente investigación se utilizó el conjunto de programas de la Suite Vector NTI Advance versión 11 (<http://www.invitrogen.com>). Los ensambles fueron realizados utilizando la herramienta ContigExpress que viene incluida en la versión 11 de la Suite Vector NTI y se trabajó con los parámetros utilizados por MIFAB para el ensamble de los ESTs de frutilla blanca (mínimo de alineamiento: 40 pb; mínimo de identidad: 94%). Todas las figuras de secuencias y alineamientos fueron preparados con las herramientas de administración de secuencias de la Suite Vector NTI versión 11.

3.- Ensayos enzimáticos.

3.1.- Extracción de proteínas de frutilla roja y frutilla blanca.

Para la extracción de proteínas fue utilizado un protocolo modificado de Leone y col (2006). Se homogenizó mediante vortex 5 g de molido fino de frutillas congeladas

(previamente molidas en mortero frío) con 10 ml de buffer de extracción (Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M; KCl 1 M), 2 g de polivinilpirrolidona y 20 mg de proteasa (1 mg/ml) a temperatura ambiente. La solución resultante fue centrifugada a 20.000 g por 20 minutos y el sobrenadante fue traspasado a un tubo falcon de 15 ml. Las proteínas fueron cuantificadas de acuerdo al método de Bradford (1976) a una longitud de onda de 570 nm mediante un espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpec, SHIMADZU). Se utilizó Coomassie como agente colorante y BSA como estándar de proteínas.

3.2.- Ensayo enzimático de actividad LOX.

La actividad de LOX fue determinada siguiendo la transformación de ácido linolénico (LNA) a hidroperóxido (HPOT), cuya formación de un enlace dieno puede ser monitoreado espectrofotométricamente a 234 nm (Axelrod y col, 1981). La mezcla de reacción contiene 1 ml de buffer sodio fosfato 0,1 M (pH 6,0), LNA 10 mM y una cantidad apropiada del extracto (5-20 μ l). El aumento en la absorbancia a 234 nm fue registrada por 5 minutos. La actividad LOX fue determinada como la formación de HPOT en nmol por minuto por mg de proteína, usando un coeficiente de extinción de 25.000 $M^{-1}cm^{-1}$. La cantidad de proteína a utilizar fue calibrada según la cantidad mínima de proteína necesaria para obtener una actividad estable y observable a lo largo del tiempo.

RESULTADOS

1.- Extracción de RNA total y síntesis de cDNA desde fruto y hoja de frutilla.

Se realizó una extracción de RNA total desde frutos y hojas de frutilla blanca y frutilla roja como primer paso para la obtención del cDNA necesario para los análisis de expresión de genes. El resultado de esta extracción fue evaluado mediante electroforesis en gel denaturante (Figura 5). La electroforesis del RNA de hoja se corrió en un gel diferente y por mayor tiempo respecto del RNA de frutos para lograr mayor separación de bandas. En los carriles correspondientes a RNA de fruto se observan dos bandas las cuales corresponden a los RNA ribosomales 26S y 18S. En el caso de RNA de hoja se observan más bandas que corresponden a los RNA ribosomales 28S, 25S, 23S, 18S y 16S. La presencia de un mayor número de RNAs ribosomales es debido a que en hoja, al contrario de lo que sucede en fruto, se encuentra completamente activo el cloroplasto pues el tejido está efectuando fotosíntesis, y este organelo posee su propia maquinaria de expresión y genes ribosomales diferentes a los de la maquinaria de expresión del núcleo.

También se realizó cuantificación espectrofotométrica del RNA extraído (Tabla 1), y en base a los parámetros de calidad esperados ($A_{260}/A_{240} > 1$ y $A_{260}/A_{280} > 1,8$), se puede decir que se obtuvo un RNA de buena calidad desde todos los tejidos.

La variación en la intensidad de las bandas ribosomales para las distintas muestras de fruto puede estar relacionada a problemas de cuantificación espectrofotométrica (pues en todos los carriles se cargó la misma cantidad de RNA). Sin embargo lo anterior no influye en la evaluación de la calidad mediante electroforesis.

	Tejido de origen	Volúmen [μl]	Relación 260/240	Relación 260/280	Concentración [μg/μl]	RNA total [μg]
frutilla roja	S1	40	1,0	1,7	2,53	101,31
	S2	40	1,7	2,0	2,46	98,56
	S3	40	1,7	2,0	1,34	53,79
	S4	20	1,7	1,9	0,55	10,96
	Hoja	40	1,8	2,0	2,17	86,78
frutilla blanca	S1	40	1,8	2,0	1,73	69,02
	S2	40	1,9	1,8	0,52	20,93
	S3	40	1,6	1,9	1,11	44,26
	S4	40	1,4	1,7	2,55	101,86
	Hoja	40	1,8	1,9	2,88	115,01

Tabla 1: Cuantificación de RNA total de fruto (cuatro estadios de desarrollo) y hoja extraído desde frutilla roja y frutilla blanca. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo del fruto ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente.

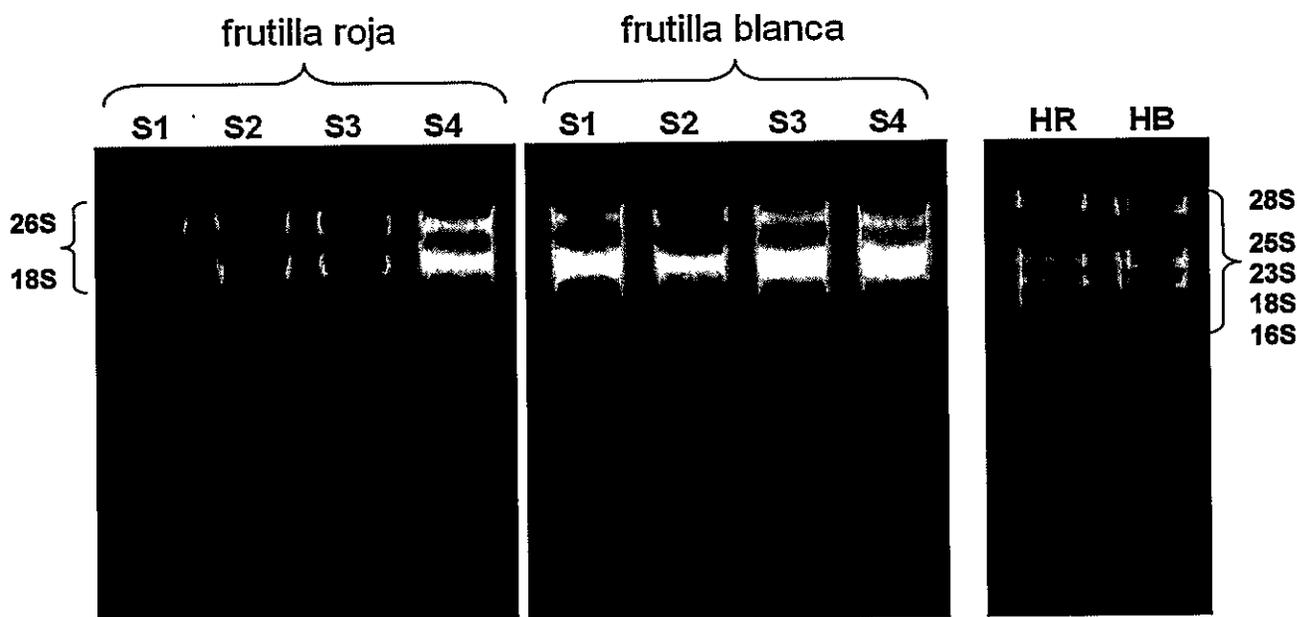


Figura 5: Electroforesis en gel denaturante de RNA total de fruto (cuatro estadios de desarrollo) y hoja extraído desde frutilla roja y frutilla blanca. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor, respectivamente. HR=Hoja de frutilla roja, HB=Hoja de frutilla blanca. 28S, 25S, 23S, 18S y 16S corresponden al RNA ribosomal. Se cargó 1 μg por carril. El RNA de hojas se corrió en un gel diferente y por mayor tiempo respecto del RNA fruto para lograr mayor separación de bandas.

A partir del RNA total extraído, se realizó la síntesis de cDNA mediante RT-PCR según lo descrito en Materiales y Métodos, obteniendo finalmente el cDNA que fue utilizado durante el desarrollo de la presente investigación.

En la Figura 6 se observa el control de amplificación utilizado para comprobar la calidad de los cDNAs sintetizados. El control positivo consiste en la amplificación de 440pb del gen de la O-Metil Transferasa (OMT) con partidores diseñados en base a la secuencia del gen en frutilla blanca; Se observa amplificación positiva en todos los carriles. Además, una segunda banda de menor tamaño que corresponde a dímeros de partidores pues también se observa en el control negativo.

En el control negativo (C-) se utilizó una muestra de RNA post tratamiento con DNAsa pero sin reacción de transcripción reversa, por lo cual de existir amplificación del gen codificante para la enzima OMT, indicaría que hay contaminación de DNA genómico en las muestras. Solo se observa una banda de bajo tamaño que corresponde a los dímeros de partidores. El control interno del kit (C+) consiste en la transcripción reversa del RNA del gen de resistencia a kanamicina. Su amplificación por PCR desde el cDNA sintetizado indica que la reacción de transcripción reversa fue exitosa.

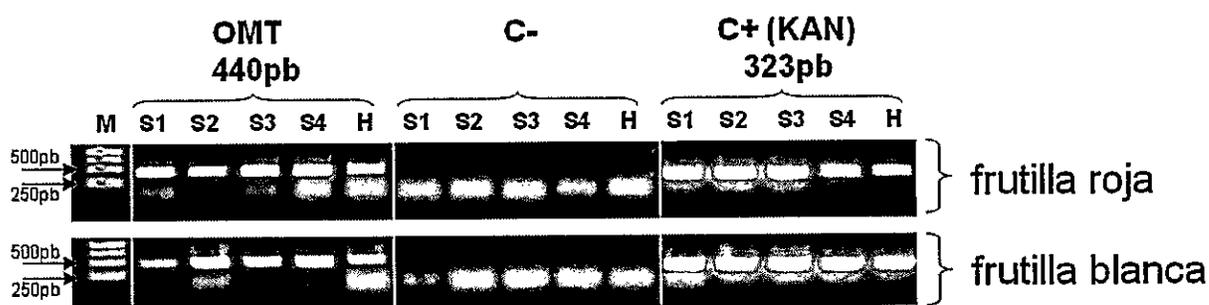


Figura 6: Síntesis de cDNA de frutos de frutilla roja y frutilla blanca en diferentes estadios de desarrollo. gOMT=Control positivo de amplificación (gen codificante para la enzima O-Metil Transferasa). C+(KAN)= Control positivo de la reacción de síntesis de cDNA (segmento del gen de resistencia a kanamicina). C-= Control negativo. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo del fruto ordenados de menor a mayor desarrollo respectivamente. H= Hoja. Se cargó 10 µl de producto de PCR por carril.

2.- Análisis relacionados con la ruta de biosíntesis del compuesto E2-Z6-nonadienol (NDE).

2.1.- Búsqueda bioinformática de genes ortólogos.

Tomando como base la ruta metabólica descrita por Buescher y col (2001) en pepino, se identificaron genes potencialmente involucrados en el proceso de biosíntesis de nonadienol, lo cual se realizó mediante una búsqueda directa en la anotación de los unigenes de frutilla blanca en la base de datos MIFAB. La Figura 7 muestra el esquema general de la ruta de biosíntesis y los genes ortólogos identificados.

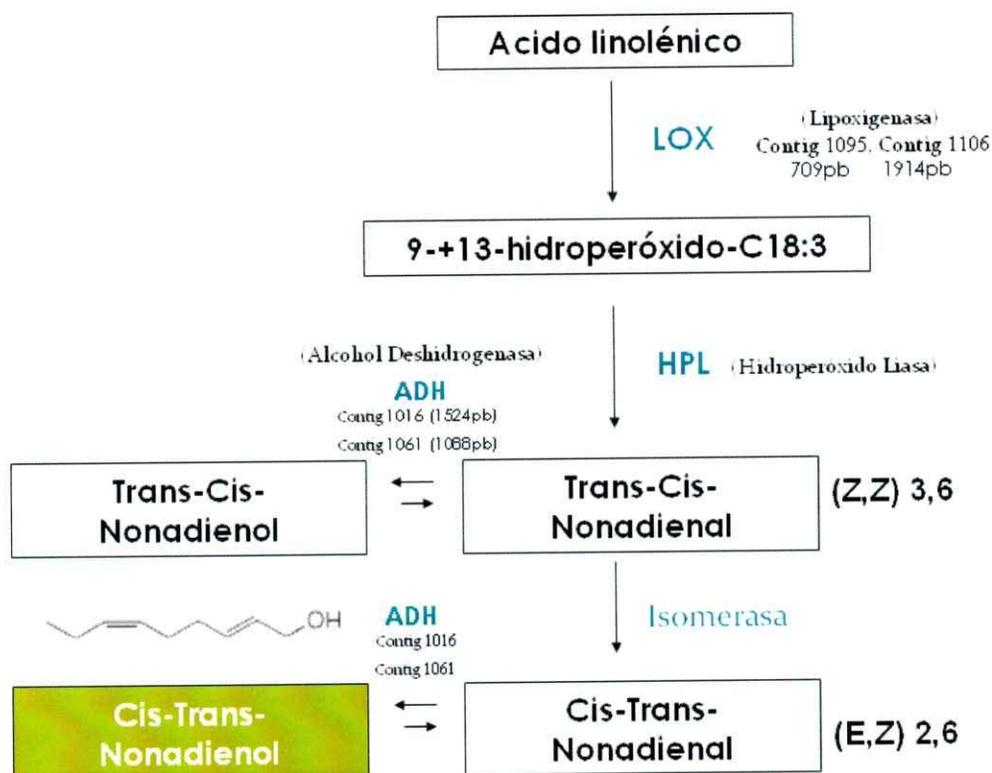


Figura 7: Modelo de la ruta de biosíntesis de nonadienol basada en Baldwin y col (2000) y Buescher y col (2001). Al lado del nombre de cada enzima se presenta el nombre del gen ortólogo encontrado en la base de datos de frutilla blanca. En negrita se destaca la configuración química de los compuestos. En verde se destaca el compuesto detectado solo en frutilla blanca.

Como se observa en la Figura 7, para el gen de la enzima Lipoxigenasa (LOX) existen dos genes ortólogos: Contig1095 (FcLOX1) y Contig1106 (FcLOX2).

El Contig1106 posee un 71% de identidad BlastX con la enzima 9-LOX de *Solanum tuberosum* (84% de similitud), además de presentar múltiples alineamientos de alta identidad con otras enzimas 9-LOX de diferentes especies (Figura 8).

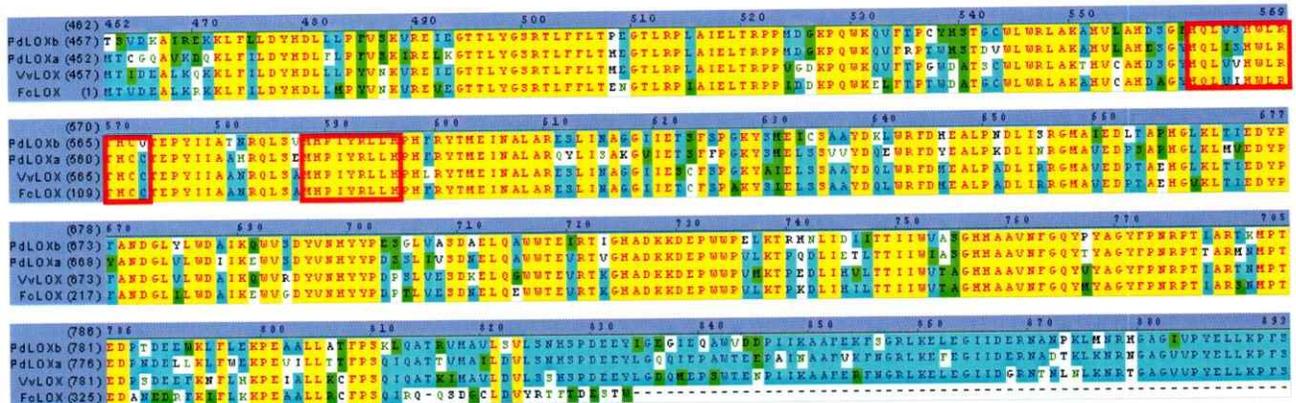


Figura 8: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas entre LOX de *F. chiloensis* (FcLOX2), *V. vinifera* (VvLOX) y *Populus deltoides* (PpCCD1a y PpCCD1b). La figura muestra la alta homología (sobre 74% de identidad) de FcLOX2 con enzimas 9-LOXs de otras especies. Los recuadros rojos muestran dos sitios de unión de hierro descritos como la característica principal de esta enzima. Fondo amarillo: residuos idénticos; fondo celeste: residuos conservados; fondo verde: residuos débilmente similares y fondo blanco: residuos distintos.

En base a lo anterior, se diseñaron partidores para amplificar 317 pb en la zona central del Contig1106 (partidor directo:LOX2aF; partidor reverso:LOX2a2R; Figura 9) para realizar ensayos de expresión diferencial (PCR convencional y PCR en Tiempo Real).

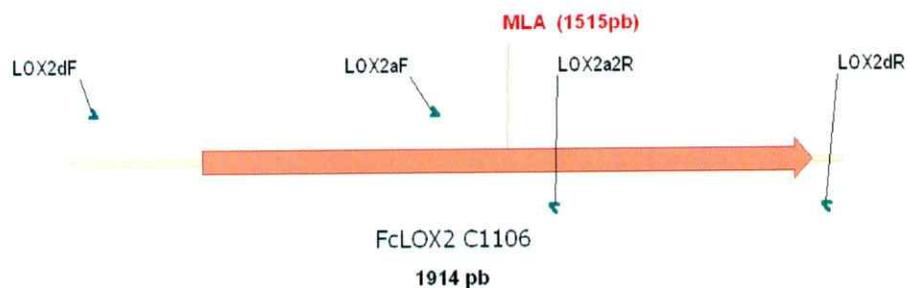


Figura 9: Representación esquemática del gen para la enzima Lipoxigenasa C9 de frutilla blanca (Contig 1106, FcLOX2). Se representa la posición de los partidores utilizados para los análisis de expresión. En naranja se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para el gen.

El Contig1095 fue descartado como gen codificante ortólogo de la enzima 9-LOX de esta ruta metabólica, debido a que no posee homología aminoacídica significativa con la 9-LOX de papa en comparación con la homología del otro contig encontrado. Además, al hacer BlastX contra la base de datos no redundante de NCBI se obtienen alineamientos con identidad menor a 40% y además el marco de lectura abierto predicho para este contig es menor al esperado para este tipo de enzima.

Respecto a la enzima Hidroperóxido Liasa (HPL), no se encontraron genes ortólogos en frutilla blanca luego de la búsqueda por homología en base a la anotación de los unigenes de MIFAB, ni por alineamientos BlastX de estos unigenes contra secuencias aminoacídicas de HPL de pepino, tomate, tabaco y arabidopsis. Sin embargo, durante el desarrollo de la presente investigación se publicó la única evidencia de la presencia de HPL en un miembro del mismo género que corresponde a *Fragaria vesca*. Esta especie es utilizada como planta de frutilla modelo para estudios genómicos dentro de este género debido a que posee un genoma diploide. La evidencia consiste en dos ESTs disponibles en NCBI los cuales ensamblan en un contig de 917 pb (Contig3361, ensamble V4 de *Fragaria*, proyecto RosIGI (Rosaceae International Genomics Initiative)). Esta información está disponible en GDR (Genome Database for Rosaceae, <http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/>). En base a este contig se diseñaron un par de partidores que amplificaran 251 pb (partidor directo:FvHPL1aF; partidor reverso:FvHPL1aR) (Figura 10).

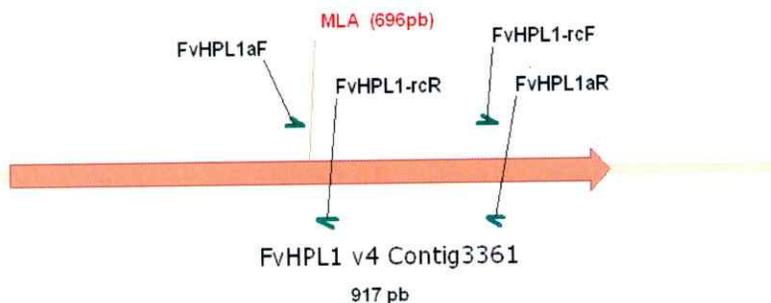


Figura 10: Representación esquemática del gen para la enzima HPL de *F. vesca*. Se presenta la posición de cuatro partidores. Los partidores FvHPL1aF y FvHPL1aR fueron utilizados para comprobar la existencia del gen en frutilla blanca. Los partidores FvHPL1-rcR y FvHPL1-rcF fueron utilizados para el experimento de RACE. En naranja se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para este gen.

En el caso de la enzima ADH, el primer gen ortólogo (Contig1016) posee 87% de identidad BlastX con ADH de melón (*Cucumis Melo*), además de numerosos alineamientos dentro de este rango de porcentaje con otras especies. Su marco de lectura abierto de 1.515 pb coincide con el tamaño descrito para otras enzimas ADH (Figura 11), por lo cual se diseñaron 2 pares de partidores que permitieran analizar la expresión diferencial del transcrito tanto por PCR convencional como por PCR en tiempo real (partidor directo: FcADH1aF; partidor reverso FcADH1R2)

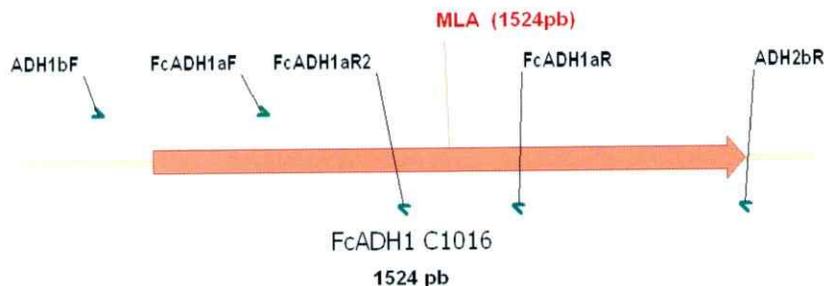


Figura 11: Representación esquemática del gen para la enzima Alcohol Deshidrogenasa de frutilla blanca (Contig 1106). Se representan la posición de los partidores utilizados en el análisis de expresión. En naranja se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para el gen.

El segundo gen ortólogo codificante para ADH, el Contig1061, presenta homología con una ADH específica, la Cinamoil ADH. Esta enzima pertenece a la ruta de biosíntesis de lignina y no hay antecedentes de que participe en la ruta de biosíntesis del nonadienol, por lo cual no fue considerada para este trabajo.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características de las secuencias identificadas.

Gen	Código	Tamaño	MLA	Principal Gen Ortólogo (BlastX)	Tamaño del gen ortólogo	BlastX	
		[pb]	[pb]		aminoácidos	%identidad	%similitud
gLOX	FcLOX2	1.914	1.515	gb ACQ76787.1 lipoxygenase [<i>Camellia sinensis</i>]	901	76	88
				emb CAA65268.1 9-lipoxygenase [<i>Solanum tuberosum</i>]	889	71	84
gHPL	FcHPL	1.216	0	gb AAO72740.1 fatty acid hydroperoxide lyase [<i>Citrus sinensis</i>]	499	61	68
gADH	FcADH1	1.524	1.140	emb CAA80691.1 alcohol dehydrogenase-1F [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	380	88	93

Tabla 2: Resumen de las características de los genes identificados en la ruta metabólica propuesta para la biosíntesis del compuesto nonadienol en frutilla blanca. gLOX= Gen codificante para Lipoxigenasa. gHPL= Gen codificante para Hidroperóxido Liasa. gADH= Gen codificante para Alcohol Deshidrogenasa. Además se presenta el mejor gen ortólogo identificado mediante BlastX contra la base de datos no redundante de NCBI. Para la ubicación de los genes en la ruta de biosíntesis y referencias revisar la Figura 7. MLA= Marco de lectura abierto. El tamaño se presenta en pares de base (pb). Código= Nombre asignado al gen ortólogo encontrado en frutilla blanca.

2.2.- Amplificación de genes.

Con el fin de estudiar la expresión de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del nonadienol en frutilla blanca y frutilla roja, se realizó un ensayo de amplificación mediante PCR utilizando como muestra DNA genómico y cDNA de diferentes estadios de desarrollo del fruto. En el caso de frutilla blanca también se utilizó cDNA de diferentes tejidos (Figura 12). Este ensayo se realizó sólo para los genes codificantes

de las enzimas LOX y HPL, ya que son las enzimas de esta ruta que presentan mayor especificidad por el sustrato (Buescher y col, 2001).

Como se observa en la Figura 12, existe una notoria diferencia en el tamaño del amplicón del gen para LOX entre una muestra de DNA genómico y cDNA, lo cual podría dar cuenta de la presencia de al menos un intrón en la zona media del gen que es donde fueron diseñados los partidores LOX2aF y LOX2a2R (ver Figura 12). En nuestras condiciones experimentales no fue posible amplificar este gen en hoja, flor y raíz de frutilla blanca. Sin embargo, no es posible llegar a una conclusión respecto a la expresión de genes utilizando esta técnica pues la cantidad de cDNA utilizado presenta variación según se observa con la amplificación del gen de referencia 18S (nivel irregular de expresión) y es notoriamente menor en el cDNA de hoja, flor y raíz de frutilla blanca. Por otro lado, se observa una leve amplificación del gen codificante para HPL en estos tejidos lo cual indicaría que el gen estaría siendo expresado.

Se observa, además, que el gen codificante para HPL está presente en todos los estadios de desarrollo del fruto, tanto en frutilla blanca como frutilla roja a pesar que las bandas en ésta última son de baja intensidad. Tanto en la amplificación del gen para LOX como para HPL se observa una segunda banda de bajo peso molecular (menor a 100 pb) que corresponde a la formación de dímeros de partidores pues también aparece en el control negativo.

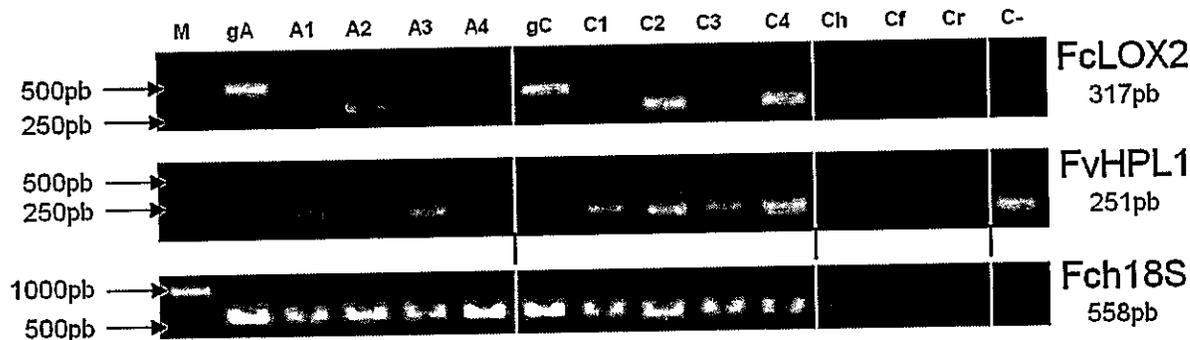


Figura 12: Expresión de genes que participan en la ruta de síntesis del compuesto nonadienol. FcLOX2= Amplificación de un fragmento del gen para Lipoxigenasa; FvHPL= Amplificación de un fragmento del gen para Hidroperóxido Liasa; Fch18S= Amplificación de un fragmento del gen 18S que se utiliza como control de amplificación. M= Marcador de peso molecular 1kb (200ng). gA= DNA genómico de frutilla roja. A1 hasta A4= cDNA de estadios S1 a S4 de frutilla roja, respectivamente. gC= DNA genómico de frutilla blanca. C1 hasta C4= cDNA de estadios S1 a S4 de frutilla blanca, respectivamente. Ch= cDNA de hoja, Cf= cDNA de flor y Cr= cDNA de raíz de frutilla blanca. C-= control negativo. Se cargaron 10 µl de producto de PCR.

2.3.- Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real para LOX y HPL.

Según los resultados observados en la amplificación por PCR de los genes LOX y HPL, no existe una diferenciación absoluta entre los diferentes estadios estudiados (presencia o ausencia del amplicón). Por lo tanto el siguiente paso fue realizar un ensayo de mayor sensibilidad y con capacidad cuantitativa. Por esta razón, para estudiar en detalle la expresión diferencial de los genes codificantes para las enzimas HPL y LOX, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Los ensayos se realizaron en triplicado y utilizando dos muestras biológicas (2 extracciones de RNA independientes). Los partidores fueron validados mediante análisis de curva de calibración que permite determinar la eficiencia de la amplificación y mediante determinación de curva de disociación que permite evaluar la especificidad de los partidores (datos no mostrados). Para este experimento se utilizó como gen de referencia el gen codificante para la enzima GapDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) debido a que los partidores diseñados para el gen 18S presentaban

problemas en la curva de disociación. Se comprobó que los partidores para el gen de la GapDH amplifican de forma similar a los partidores del gen 18S en todas las muestras utilizadas. Además se realizó una curva de calibración para los partidores del nuevo gen de referencia y se comprobó que posee una eficiencia de amplificación de 103,7%, lo cual está dentro del rango esperado para una amplificación óptima (entre 90% y 110%).

En la Figura 13 se observa la variación de expresión del gen LOX en frutilla roja y frutilla blanca y en la Figura 14 la variación de expresión del gen HPL. Los valores de expresión fueron normalizados según la señal más alta, lo cual corresponde en ambos casos a la expresión en el estadio de desarrollo S3 de frutilla blanca. Lo anterior permite facilitar la comparación de las mediciones entre ambas especies.

Se observa en la Figura 13 que la expresión relativa de LOX disminuye a la mitad en los estadios S3 y S4 de frutilla roja; sin embargo, en frutilla blanca se observa que la expresión aumenta en S3 y comienza a disminuir en S4. También existe una diferencia de expresión importante entre las hoja de ambas especies, ya que la expresión en frutilla roja duplica la expresión en frutilla blanca.

En la Figura 14 se observa que la expresión relativa del gen codificante para la enzima HPL posee una notoria diferencia en el patrón de expresión entre ambas especies. Mientras en frutilla roja el máximo ocurre en los estadios de desarrollo S1 y S2, en frutilla blanca el máximo se produce en S3 y su valor duplica los valores máximos observados en frutilla roja. De igual forma la expresión en hoja de frutilla blanca duplica a la expresión en hoja de frutilla roja.

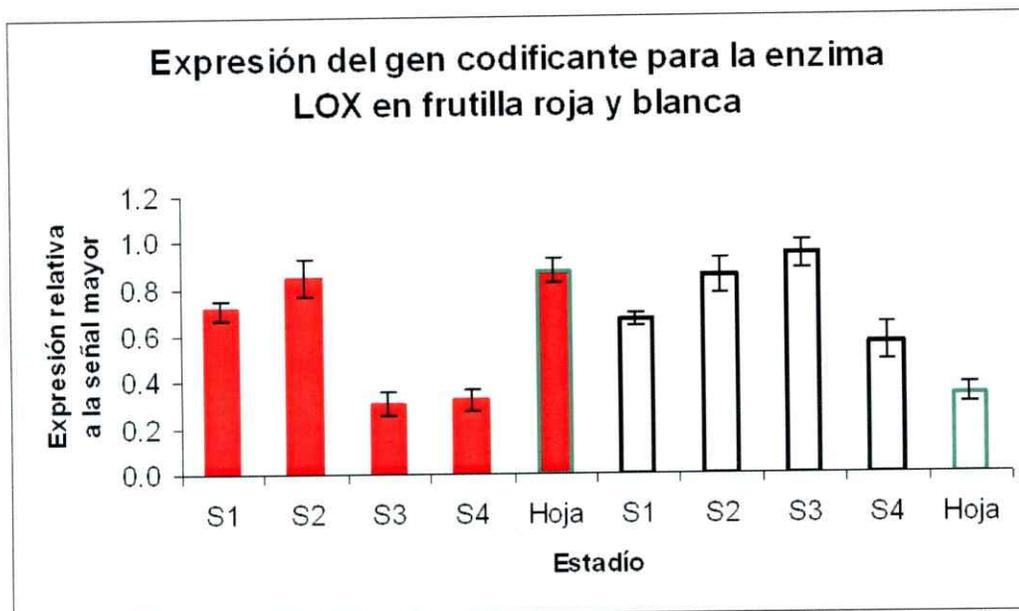


Figura 13: Expresión relativa del gen codificante para la enzima LOX en cada estadio de desarrollo del fruto y en hoja analizada por PCR en tiempo real. Con barras rojas se representa la expresión del gen en frutilla roja y con barras blancas la expresión del gen en frutilla blanca. La expresión relativa está calculada en función de la señal máxima que corresponde a la expresión en el estadio de desarrollo S3 de frutilla blanca. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente.

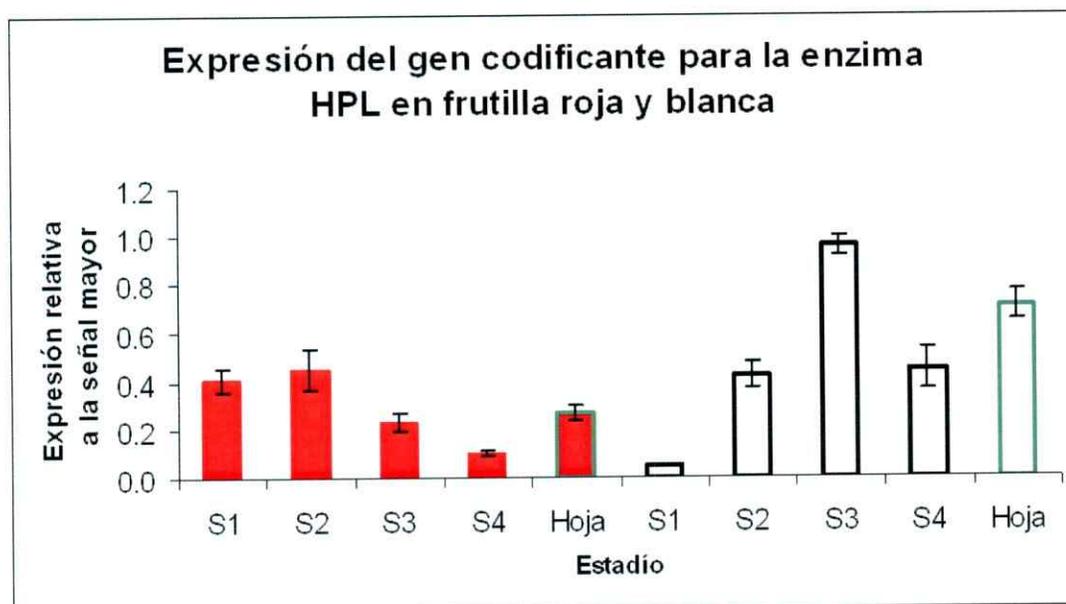


Figura 14: Expresión relativa del gen codificante para la enzima HPL en cada estadio de desarrollo del fruto y en hoja analizada por PCR en tiempo real. Con barras rojas se representa la expresión del gen en frutilla roja y con barras blancas la expresión del gen en frutilla blanca. La expresión relativa está calculada en función de la señal máxima que corresponde a la expresión en el estadio de desarrollo S3 de frutilla blanca. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente.

2.4.- Ensayo enzimático para LOX.

Luego de estudiar el perfil de expresión del gen codificante para la enzima LOX y observar que está presente en todas las muestras analizadas, se realizó un ensayo de la actividad de la enzima para observar si es funcional en ambas especies de frutilla, utilizando extractos crudos de cada estadio de desarrollo de fruto analizado y también en hoja.

Los datos fueron registrados en triplicado y se utilizaron dos muestras biológicas lo que equivale a dos extracciones de proteínas por cada muestra. La actividad que es expresada en nmol de hidróperóxido formado por minuto por miligramo de proteína, fue calculada midiendo los cambios de absorbancia a 234 nm (Figura 15). Se observa que existe actividad enzimática en todas las muestras analizadas lo cual se correlaciona con lo observado en la expresión del gen codificante para la enzima. Además hay un patrón de actividad enzimática similar entre ambas especies con un máximo en el estadio de desarrollo S1 y una disminución paulatina en los otros estadios. Este patrón es diferente a lo observado a nivel de expresión génica lo cual es de esperarse pues, luego de la expresión del gen, existen diferentes factores como la tasa de traducción del transcrito, modificaciones post-traduccionales, disponibilidad y niveles de sustrato, umbrales de actividad, etc., los cuales actúan de forma no lineal respecto a la abundancia del gen en un momento dado modificando finalmente la cantidad de enzima funcional disponible. Además este ensayo no permite medir la actividad específica de la enzima pues es probable (aunque no está descrito) que haya interferencia de otras enzimas capaces de formar el enlace dieno-conjugado utilizado como señal de transformación de sustrato en este experimento.

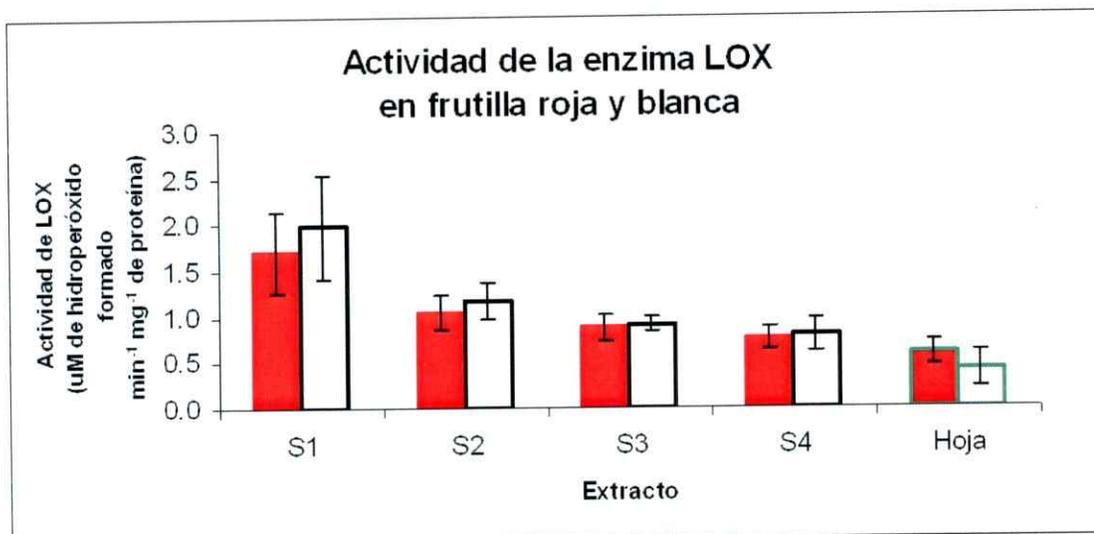


Figura 15: Cambios en la actividad enzimática de LOX en extractos crudos de proteína. Con barras rojas se representa la actividad de la enzima en frutilla roja y con barras blancas la actividad de la enzima en frutilla blanca. La desviación estándar corresponde al análisis de los datos recolectados de dos extracciones independientes para cada estadio de estudio y tres repeticiones del ensayo en cada muestra (6 mediciones en total). S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente.

2.5.- RACE de HPL.

Como el gen HPL no ha sido identificado en frutilla blanca, a partir de la información de secuencia del contig encontrado en *F. vesca* y del amplicón obtenido desde HPL en frutilla blanca se diseñaron dos pares de partidores que permitieron realizar una reacción RACE (dirección 5' y dirección 3') con el fin de identificar el gen completo de HPL en frutilla blanca (ver sección 2.11.2 de Materiales y Métodos).

Se obtuvo un amplicón de ~650 pb para el extremo 5' y un amplicón de ~700 pb para el extremo 3', los cuales fueron clonados y secuenciados desde ambos extremos según lo descrito en Materiales y Métodos. En la Figura 16 se presenta el ensamble final de todos los segmentos secuenciados de HPL en frutilla blanca teniendo como base el contig de HPL de *F. vesca*, con lo cual se obtiene un contig final de 1.216 pb.

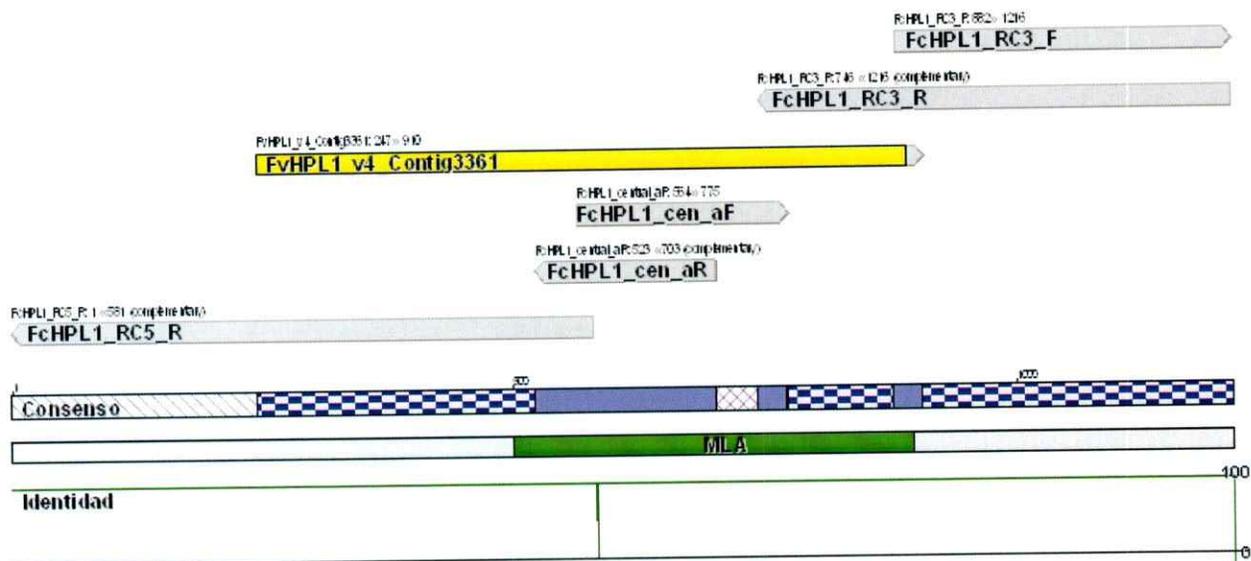


Figura 16: Ensamble de secuencias de HPL de frutilla blanca. En gris se observan los fragmentos secuenciados y en amarillo se presenta el contig con homología a HPL de *F. vesca*, el cual sirve de base para la formación del nuevo contig. La barra **consenso** es la representación de la secuencia ensamblada y el achurado indica el grado de aporte de cada fragmento (mayor achurado indica mayor número de secuencias participando en el consenso). La barra **identidad** indica el porcentaje de identidad de cada base que forma el consenso respecto a los diferentes fragmentos de secuencias participantes. En verde se presenta el único marco de lectura abierto (MLA) predicho en las 1.216 pb del consenso.

3.- Análisis relacionados con la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico.

3.1.- Búsqueda bioinformática de genes ortólogos.

En base a las dos rutas metabólicas descritas para la biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir ácido cinámico, se identificaron diferentes genes ortólogos. Esto se realizó mediante una búsqueda directa en la anotación de los unigenes de frutilla blanca de MIFAB. En la Figura 17 se presenta el esquema general de ambas rutas y los genes ortólogos identificados.

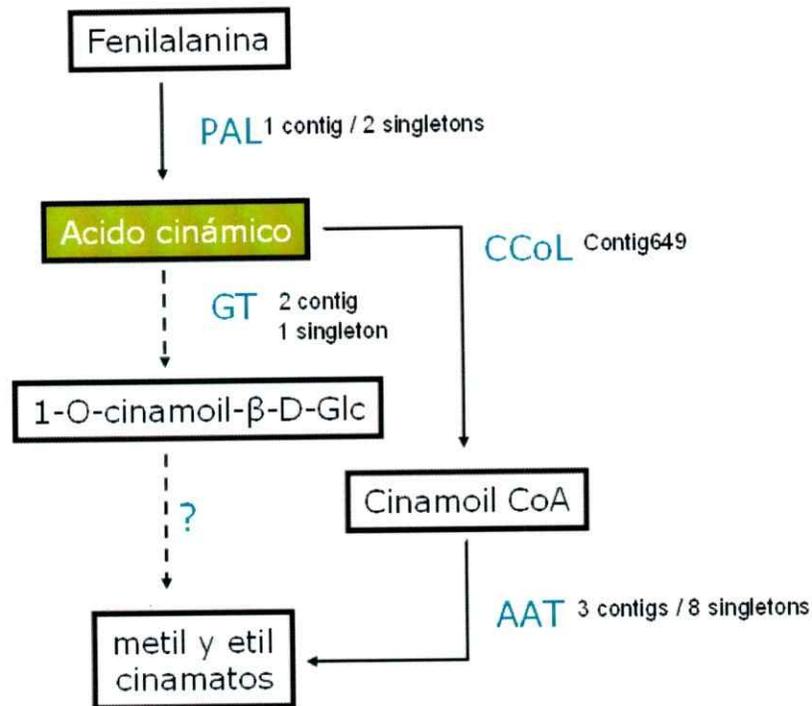


Figura 17: Modelo de la ruta de biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico. La ruta con línea segmentada está basada en Lunkenbein y col (2006b) y la ruta con línea continua en Aharoni y col (2000). Al lado del nombre de cada enzima se presenta el gen ortólogo identificado en la base de datos de frutilla blanca. En verde se destaca el compuesto detectado en frutilla blanca.

Como se observa en la figura anterior, para el caso de la enzima PAL se encontró un contig y dos singletons ortólogos al gen codificante. Durante el desarrollo de la presente tesis se trabajó en la re-secuenciación de diferentes clones de la genoteca MIFAB para extender las secuencias conocidas. En base a éste trabajo, fue posible armar un nuevo contig que incluye el contig previamente identificado y uno de los singletons, además de aumentar el tamaño de secuencia conocida desde 1.258 pb a 1.561 pb (Figura 18). Al hacer un estudio de homología usando BlastX contra la base de datos no redundante de NCBI, se observa que el mejor alineamiento de este nuevo contig (FcPAL1) es contra la enzima PAL1 de *Rubus idaeus* (frambuesa) con un 91% de identidad (95% de similitud). Los siguientes alineamientos confirman que pertenece

a la isoforma 1 de esta enzima. Lunkenbein y col (2006a) describieron que la isoforma 1 posee un perfil de actividad directamente asociado a la liberación de compuestos aromáticos (etil y metil ester de cinamato). De esta forma, estaría involucrada en un proceso alternativo a la producción de fenilpropanoides (lignina) o flavonoides (pigmentos) como ocurre con las otras isoformas.

Respecto al singleton restante, el proceso de re-secuenciación de los clones permitió extender la secuencia conocida. Con las secuencias nuevas se construyó el contig FcPAL2 de 912 pb (Figura 19). Al hacer BlastX de este contig contra la base de datos no redundante de NCBI se obtiene el mejor match contra la enzima PAL2 de frambuesa con un 63% de identidad (69% de similitud) y los siguientes alineamientos del resultado Blast confirman que pertenece a la isoforma 2 de esta enzima. Debido a lo anterior este gen ortólogo no será considerado dentro del análisis actual.

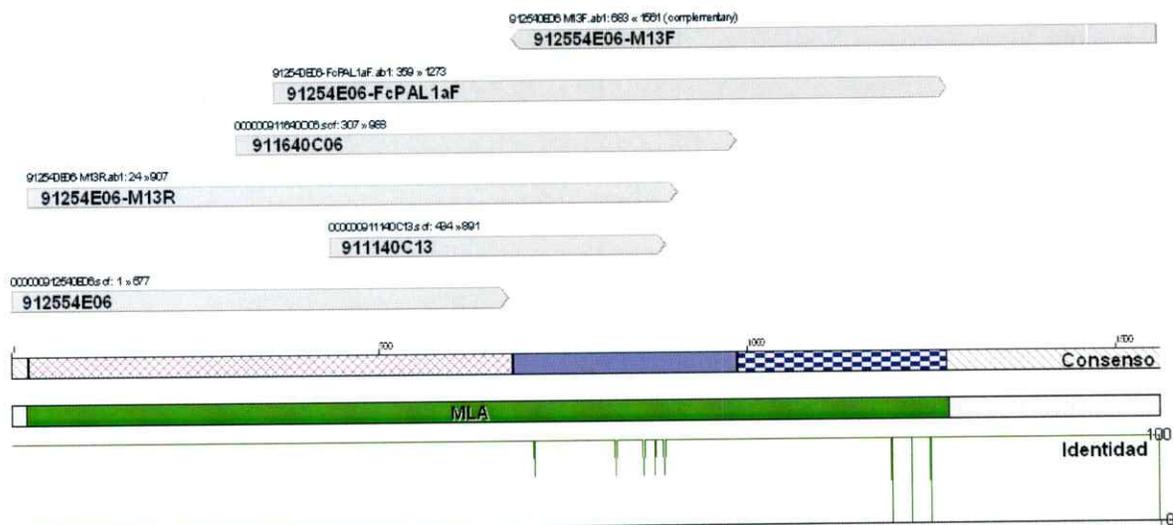


Figura 18: Ensamble de secuencias de FcPAL1 de frutilla blanca. En gris se observan los fragmentos secuenciados. La barra **consenso** es la representación de la secuencia ensamblada y el achurado indica el grado de aporte de cada fragmento (mayor achurado indica mayor numero de secuencias participando en el consenso). La barra **identidad** indica el porcentaje de identidad de cada base que forma el consenso respecto a los diferentes fragmentos de secuencias participantes. En verde se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para el consenso.

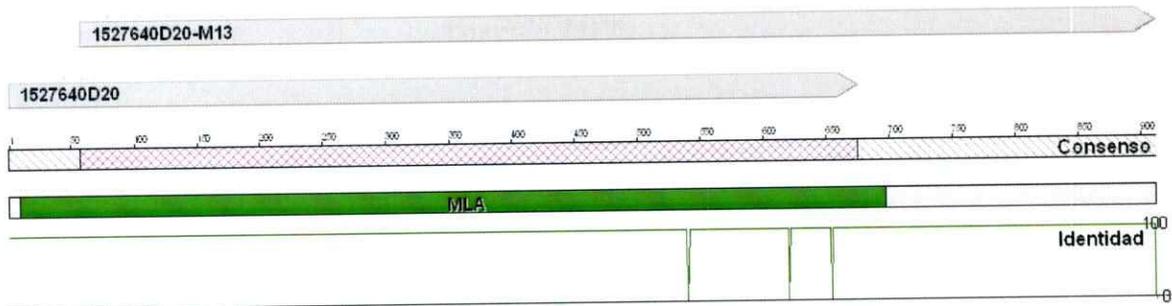


Figura 19: Ensamble de secuencias de FcPAL2 de frutilla blanca. En gris se observan los fragmentos secuenciados. La barra **consenso** es la representación de la secuencia ensamblada y el achurado indica el grado de aporte de cada fragmento (mayor achurado indica mayor número de secuencias participando en el consenso). La barra **identidad** indica el porcentaje de identidad de cada base que forma el consenso respecto a los diferentes fragmentos de secuencias participantes. En verde se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para el consenso.

Finalmente, se diseñaron 2 pares de partidores en base al contig FcPAL1 (directo: FcPAL1aF; reverso: FcPAL1aR) para estudiar la expresión del gen (Figura 20).

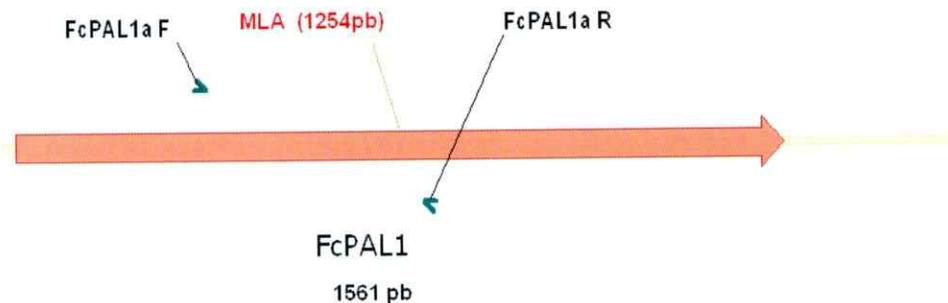


Figura 20: Representación esquemática del gen FcPAL1 de frutilla blanca. Se presenta la posición de los partidores que fueron utilizados para las reacciones de PCR. En naranja se presenta el marco de lectura abierto (MLA) predicho para este gen.

Para la enzima CCoL se encontró un solo un contig ortólogo al gen codificante (Contig649, 816 pb) por lo cual se diseñaron partidores en base a esta secuencia (directo: FcCCLRT1-F; reverso: FcCCLRT1-R; Figura 21). Al realizar la predicción de los posibles marcos de lectura abierto no se detectaron regiones codificantes. Este resultado puede explicarse por el hecho que aún no poseemos una versión completa

del gen, lo cual se deduce al comparar el tamaño del gen identificado (816 pb) con el de los genes ortólogos (~1.500 pb).



Figura 21: Representación esquemática del gen FcCCoL de frutilla blanca. Se presenta la posición de los partidores utilizados para las reacciones de PCR. No se identifica un marco de lectura abierto (MLA) para este gen.

Para la enzima GT se encontró solo un contig ortólogo al gen codificante (Contig842, 1.612 pb), el cual a su vez posee un marco de lectura abierto de 1.485 pb que coincide con lo descrito para este gen. De esta forma, la secuencia sería un cDNA de tamaño completo (Figura 22). En base a esta secuencia se diseñó un par de partidores para el análisis de expresión (directo: FcGAT2RT-F; reverso: FcGAT2RT-R).

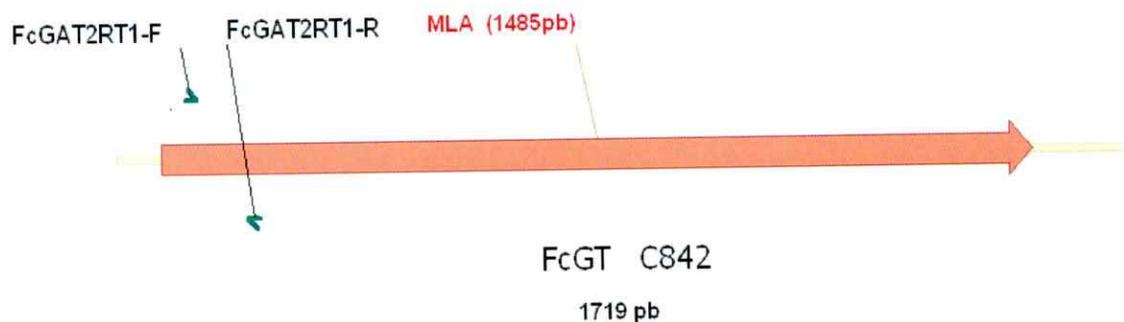


Figura 22: Representación esquemática del gen FcGT de frutilla blanca. Se presenta la posición de los partidores utilizados para las reacciones de PCR. En naranja se presenta el marco de lectura abierto predicho para este gen.

Para la enzima AAT se encontraron 3 contigs y 8 singletons con distinta homología a genes codificantes para AAT de especies de la familia Rosaceae. Como esta enzima presenta una actividad poco específica (González y col, 2009), se decidió no hacer análisis con ella dado que el objetivo de los siguientes experimentos es intentar dilucidar si existe en frutilla blanca una preferencia por una de las sub-vías en particular. Por ello se seleccionaron las enzimas que poseen una actividad más específica en cada ruta (GT y CCoL).

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las características de las secuencias identificadas.

Gen	Código	Tamaño	MLA	Principal Gen Ortólogo (BlastX)	Tamaño del gen ortólogo	BlastX	
		[pb]	[pb]		aminoácidos	%identidad	%similitud
gPAL	FcPAL	1.561	1.254	phenylalanine ammonia-lyase 1 [<i>Rubus idaeus</i>]	710	91	95
gGT	FcGT	1.719	1.485	UDP-glucose glucosyltransferase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	555	98	99
gCCoL	FcCCoL	816	0	AMP dependent CoA ligase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	543	54	69
gAAT	FcAAT	1.612	1.350	alcohol acyltransferase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	452	93	96

Tabla 3: Resumen de las características de los genes identificados en la ruta metabólica propuesta para la biosíntesis del compuesto ácido cinámico y sus compuestos derivados en frutilla blanca. gPAL= gen codificante para Fenilalanina Amonio Liasa. gGT= gen codificante para Glucosil Transferasa. CCoL= gen codificante para Cinamoil CoA Ligasa. AAT= gen codificante para Alcohol Acil Transferasa. Además se presenta el mejor gen ortólogo identificado mediante BlastX contra la base de datos no redundante de NCBI. Para la ubicación de los genes en la ruta de biosíntesis y referencias revisar la Figura 17. MLA= Marco de lectura abierto. El tamaño se presenta en pares de base (pb). Código= Nombre asignado al gen ortólogo encontrado en frutilla blanca.

3.2.- Normalización de cDNA.

Con el fin de tener una aproximación al análisis de expresión diferencial semi cuantitativo de los genes involucrados en la biosíntesis del ácido cinámico y sus derivados en los diferentes estadios de desarrollo del fruto, se realizó un experimento donde fue normalizada la cantidad de cDNA a utilizar en cada reacción de PCR mediante la cuantificación de la amplificación del gen de referencia (18S). En este experimento se realizó un PCR estándar con los partidores para el gen 18S utilizando el mismo volumen de cDNA de cada muestra. El PCR se realizó a 30 ciclos, que corresponde al mínimo de ciclos que permiten observar la aparición cuantificable del gen en todas las muestras luego de la electroforesis (datos no mostrados). Se cuantificó la banda del amplicón desde el gel de agarosa mediante el programa Quantity One (versión 4.6.3). Lo anterior permitió establecer una relación de normalización para conocer el volumen de cDNA necesario de cada muestra para obtener amplificación mediante PCR de similar intensidad para el gen 18S.

Los resultados de esta normalización están representados en la Figura 23, donde se muestra un ejemplo de la amplificación del gen 18S en los diferentes estadios de desarrollo del fruto de ambas frutillas, según la normalización obtenida por esta técnica. Al cuantificar la amplificación, se observa que ésta se mantiene dentro de los límites esperados para la técnica (variación menor al 10% entre 3 repeticiones).

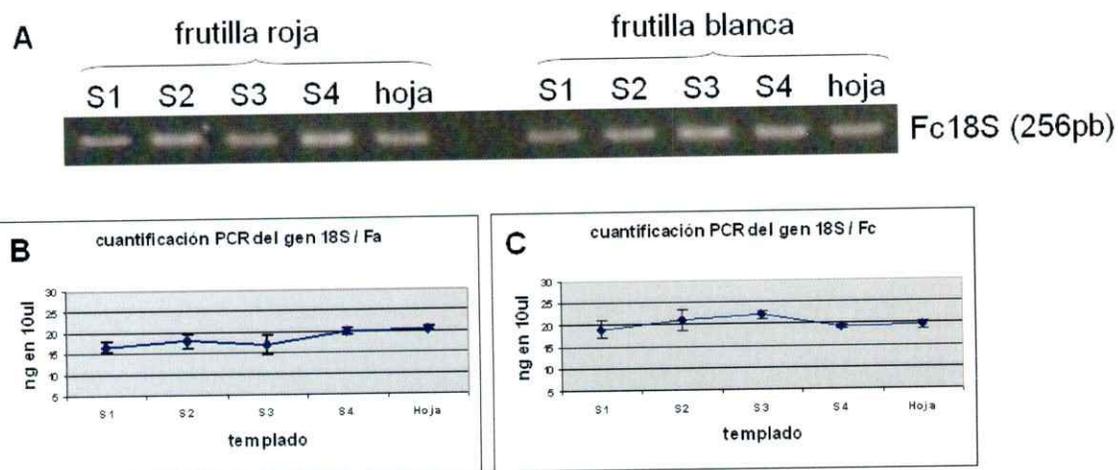


Figura 23: Amplificación del gen 18S de frutilla blanca (Fc18S, fragmento de 256pb) utilizando cDNA normalizado. Se realizaron 30 ciclos de amplificación. **A:** electroforesis de los amplicones para cada muestra según estadio de desarrollo y hoja. **B:** cuantificación de los amplicones para cada muestra de frutilla roja. **C:** cuantificación de los amplicones para cada muestra de frutilla blanca. Se realizaron 3 repeticiones y se presenta la desviación estándar asociada. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente. Se cargaron 10ul de producto de PCR.

3.3.- Amplificación de genes con normalización de cDNA.

Para observar la variación en la expresión de los amplicones de los genes propuestos para la biosíntesis del ácido cinámico y sus derivados, se realizó un PCR convencional utilizando cDNA normalizado. Esta técnica permite evaluar si existe un patrón de expresión diferencial realizando el primer paso de un PCR semi-cuantitativo pues se evalúa usando un número de ciclos constante (35 ciclos). Lo anterior es debido a que el objetivo del experimento no es determinar el nivel de expresión de cada gen en detalle sino diferenciar patrones generales. En la Figura 24 se observa el resultado de la reacción de PCR de forma comparativa para el gen que codifica para la enzima PAL, que es la enzima común de ambas rutas y para los genes que codifican para las enzimas GT y CCoL, que son las enzimas que diferencian cada ruta.

Como resultado de lo anterior, se observan algunas variaciones en el patrón de expresión de PAL, CCoL y GT entre frutilla roja y frutilla blanca. El máximo de expresión del gen codificante para la enzima PAL en frutilla roja ocurre entre S3 y S4,

mientras que en frutilla blanca es en S2, cae en S3 y vuelve a subir en S4. El gen codificante para CCoL tiene una fuerte expresión en S4 de frutilla roja, mientras en frutilla blanca el máximo se observa en S2 y S3. El gen codificante para GT presenta un patrón de expresión creciente en la medida que avanza el desarrollo del fruto de frutilla roja, mientras que en frutilla blanca presenta una alta expresión en S2 y S3. En ambas especies no se observa expresión en hoja de los genes codificantes para CCoL y GT.

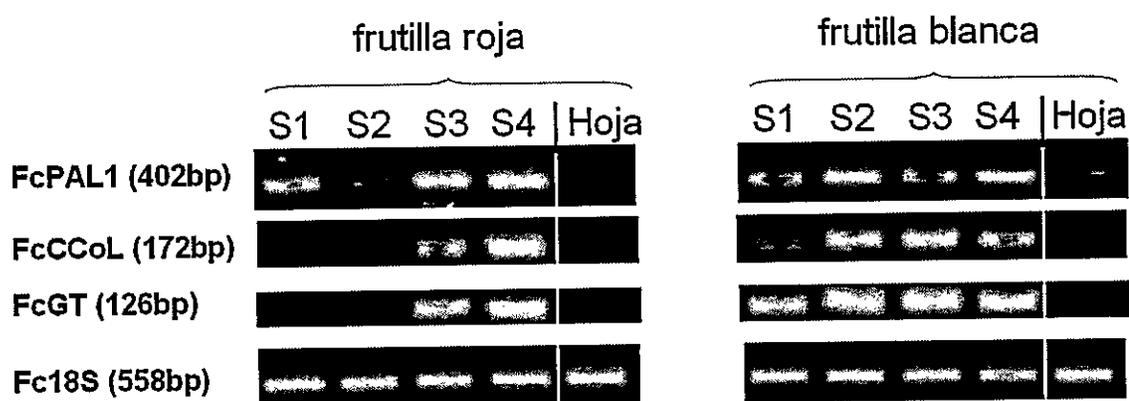


Figura 24: Amplificación de genes que participan en la ruta de síntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico utilizando cDNA normalizado. Se realizaron 35 ciclos de amplificación. Fch18S= Amplificación de un fragmento del gen 18S que se utiliza como control de amplificación, FcPAL1= Amplificación de un fragmento del gen codificante Fenilalanina Amonio Liasa, FcCCoL= Amplificación de un fragmento del gen para la Cumaroil CoA Ligasa, FcGT= Amplificación de un fragmento del gen para la Glucosil Transferasa. Se cargaron 10 µl de producto de PCR. S1 a S4 corresponden a los estadios de desarrollo de los frutos ordenados de menor a mayor desarrollo, respectivamente.

En conclusión, según lo observado en la Figura 24 no se observa una diferencia significativa en el patrón de expresión entre CCoL y GT en ninguna de las dos especies, lo cual nos impide inferir si existe una preferencia por alguna de las rutas de biosíntesis propuestas para la biosíntesis de metil y etil cinamatos a partir de ácido cinámico.

4.- Confirmación de amplicones mediante secuenciación.

Con el fin de verificar que cada fragmento obtenido mediante amplificación por PCR (amplicón) corresponde al fragmento del gen desde el cual se diseñaron los partidores, se secuenciaron los fragmentos de los genes principales en las rutas propuestas para la síntesis de nonadienol y ácido cinámico, tanto en frutilla blanca como en frutilla roja. Cada fragmento fue purificado desde gel de agarosa y secuenciado en sentido directo. Se descartaron las bases de los extremos que tuvieran calidad de lectura menor a 20 [Q<20]. Cada secuencia final fue alineada contra el gen correspondiente utilizando BlastN. En la Tabla 4 se presenta el resumen de los resultados de alineamiento de la secuencia de los fragmentos con el gen correspondiente.

Gen	Código	Tamaño del gen [pb]	Partidores	Tamaño del amplicón [pb]	Porcentaje de identidad	
					Frutilla blanca	Frutilla roja
LOX2	FcLOX2	1914	LOX2aF/LOX2bR	550	98	98
HPL	FvHPL	1216	FvHPL1dF/FvHPL1aR	438	99	99
PAL	FcPAL	1561	FcPAL1aF/FcPAL1RT1-R	667	99	98
GT	FcGT	1719	FcGAT2RT-F/FcGTaR	596	99	99
CCoL	FcCCoL	816	CCoLRT1F/CCoLaR	547	99	98
18S	Fc18S	676	Fc18SF2/Fc18SR2	534	100	100

Tabla 4: Resumen de los resultados de alineamiento BlastN de los fragmentos amplificados por PCR contra el gen respectivo. LOX= gen codificante para la enzima Lipoxigenasa. HPL= gen codificante para la enzima Hidroperóxido Liasa. PAL= gen codificante para la enzima Fenilalanina Amonio Liasa. GT= gen codificante para la enzima Glucosil Transferasa. CCoL= gen codificante para la enzima Glucosil Transferasa. 18S= gen codificante para el gen 18S.

Se observa en la Tabla 4 que los amplicones efectivamente corresponden al gen respectivo. No se alcanza el 100% de identidad debido a que aún existen en los fragmentos bases con lectura de baja calidad cerca de los extremos, las cuales no se pueden definir en primera instancia. Para lograrlo, es recomendable realizar nuevas rondas de secuenciación desde el extremo directo y el extremo reverso lo cual se aleja del objetivo inicial de este experimento.

DISCUSIÓN

En base a la ruta metabólica descrita por Buescher y col (2001) en pepino, y mediante una búsqueda directa en la anotación de los unigenes de frutilla blanca de MIFAB, se logró identificar la mayoría de los genes potencialmente involucrados en el proceso de biosíntesis de nonadienol (Tabla 2). La excepción fue para el gen codificante para la enzima HPL, el cual fue identificado mediante amplificación directa desde cDNA de frutilla blanca en estadio de desarrollo S3, utilizando partidores diseñados en base al contig número 3361 de *F. vesca* (ensamble V4 de *Fragaria*, proyecto Rosaceae International Genomics Initiative, RosIGI, <http://www.rosaceae.org>), ortólogo a HPL. Una posible explicación para el hecho que este gen no haya sido identificado en la base de datos MIFAB es que el mRNA codificante para esta enzima presente baja expresión relativa (abundancia), con lo cual queda en desventaja respecto de otros genes en la construcción de genotecas para la secuenciación masiva de ESTs efectuada por MIFAB. Esto tiene sentido si consideramos que durante la construcción de esta genoteca, no se efectuaron protocolos adicionales para asegurar la secuenciación de genes con baja abundancia.

Respecto a los genes identificados, el proceso de biosíntesis del compuesto nonadienol en pepino y tomate comienza con la hidropoxidación del ácido linolénico en el carbono número 9 efectuado por la LOX tipo C9 (Buescher y col, 2001; Baldwin y col, 2000). En el caso de frutilla blanca, se identificó un gen de tamaño completo (marco de lectura abierto y regiones no codificantes) ortólogo a este tipo de lipoxigenasas. El gen ortólogo mas cercano para este gen de frutilla blanca encontrado en las secuencias públicas de frutilla roja solo tiene un 47% de identidad BlastX (64%

de similitud) y al compararlo con LOX de papa, no pertenece al grupo de las LOX C9. A pesar de lo anterior, al utilizar los partidores diseñados de forma específica para amplificar la LOX C9 de frutilla blanca, también se obtuvo un amplicón en frutilla roja (Figuras 12 y 13), lo cual nos indica que el gen está presente y se expresa en frutilla roja, pero aún no ha sido descrito.

Respecto al patrón de expresión a lo largo del desarrollo del fruto (Figura 13) podemos decir que mientras en frutilla roja existe un máximo en S1 y S2, disminuyendo notoriamente en S3 y S4, en frutilla blanca se observa un patrón ascendente hasta S3 manteniendo una alta expresión relativa aún en S4. Esto indica una mayor disponibilidad de transcrito en frutilla blanca respecto de la roja durante el desarrollo del fruto lo cual también podría generar un desbalance en la biodisponibilidad de la enzima luego del proceso de traducción del RNA mensajero, a pesar que en el experimento de actividad enzimática no se apreció tal diferencia debido a que no era un experimento específico para la enzima estudiada. También se observa predominancia del transcrito de LOX en hoja de frutilla blanca, pero la actividad enzimática pareciera no seguir este mismo patrón, pues solo se observa que la actividad de LOX es levemente superior en hoja de frutilla roja sobre frutilla blanca.

Es importante notar que el experimento de actividad enzimática se realizó sobre un extracto crudo de proteínas, donde además de la LOX C9, puede estar presente la LOX C13 que también transforma al sustrato ácido linolénico en un dieno conjugado (Figura 2). Por lo anterior, este ensayo sólo nos permite concluir de forma general que existe actividad lipoxigenasa en ambas especies de frutilla, actividad que decae durante el desarrollo del fruto. Estos resultados de expresión y actividad de LOX se corresponden con los descritos en frutilla roja por Leone y col (2006). Los autores, además, describen que la actividad de la enzima HPL, también presenta una

disminución progresiva durante la maduración del fruto, lo cual se observa en el patrón encontrado en este trabajo para el transcrito de HPL en frutilla roja. Este patrón es completamente contrario a lo observado para frutilla blanca pues existe un aumento importante en la expresión relativa de HPL hasta S3, donde comienza a disminuir; Pero aún en S4 la expresión es mayor que lo observado en la otra especie (Figura 14).

Esta inducción del mRNA codificante para la enzima HPL podría ser crucial para sobrepasar un umbral biológico que permite la sobre activación de la ruta y, por lo tanto, una acumulación del compuesto aromático nonadienol hasta límites no solo detectables mediante instrumentos sino también perceptibles para el ser humano. De esta forma, según lo observado en la presente tesis respecto a la expresión génica, es posible inferir que el compuesto podría producirse en ambas frutillas pues en frutilla roja y blanca se observa la expresión de los genes, pero solo en blanca la acumulación del compuesto alcanza un nivel detectable y perceptible. Sin duda, desde la expresión de los genes hasta la liberación del compuesto existen distintos pasos donde puede haber una pequeña diferencia entre ambas especies que finalmente produzca una gran diferencia en la detección del compuesto. Estos pasos pueden ser modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales que produzcan una diferencia en la estructura de la enzima y, por lo tanto en actividad enzimática, variación de los niveles endógenos del sustrato (ácido linolenico) o modificación del compuesto aromático mediante procesos de glicosilación lo cual complica su detección e impide su percepción. Cada uno de estos puntos puede ser un tema de estudio particular, sin embargo se alejan del objetivo de la presente tesis en la cual se logró proponer una ruta metabólica para la síntesis del compuesto en frutilla blanca y se comprobó que los genes participantes se expresan diferencialmente durante el desarrollo del fruto.

Es interesante notar que también existe una alta expresión relativa del gen HPL en hoja de frutilla blanca respecto de hoja de frutilla roja, lo cual podría dar cuenta de otra característica distintiva entre estas dos frutillas si se correlaciona con una alta actividad de HPL y la presencia de nonadienol en hoja en futuros experimentos.

Respecto a la obtención de la secuencia del gen codificante para la enzima HPL, si bien se logró obtener secuencias de los extremos 5' y 3', aún es necesario secuenciar el gen completo a partir de estos extremos para obtener la secuencia completa de HPL en frutilla blanca, pues existen varios segmentos intermedios aún desconocidos que momentáneamente están siendo completados mediante el ensamble de todos los fragmentos obtenidos en *F. chiloensis* en conjunto con la secuencia del gen en *F. vesca*. Además, al hacer un análisis del marco de lectura abierto (MLA), se evidencian los problemas de este ensamble híbrido, pues se detecta un segmento codificante demasiado pequeño (401 pb) respecto de lo esperado (~1.100 pb; Figura 16).

Respecto a la biosíntesis de ácido cinámico, en frutilla blanca se encontraron todos los genes ortólogos para las dos rutas propuestas (Tabla 3). A partir de esta información se estudió el perfil de expresión de los genes para tener una primera aproximación a las diferencias entre las dos sub-rutas propuestas.

En el caso de la expresión del gen codificante para PAL, Cheng & Breen (2001) describieron que la actividad de esta enzima en frutilla roja sigue un patrón ascendente durante el desarrollo del fruto, con un máximo al alcanzar la maduración. Esto concuerda con el incremento paulatino de tamaño del fruto, el cual también da cuenta del aumento en la acumulación de compuestos flavonoides (pigmentos) y compuestos

aromáticos derivados del ácido cinámico. De igual forma, Lunkenbein y col (2006a) describen que la expresión del gen que codifica para la enzima PAL isoforma 1 posee un comportamiento de expresión ascendente durante el desarrollo del fruto de frutilla roja. Este mismo comportamiento se observó en el presente trabajo para frutilla roja, sin embargo, en frutilla blanca hay un patrón diferente pues presenta un máximo en S2 y luego otro máximo en S4. Si este patrón de expresión se corresponde con el patrón de actividad enzimática (no estudiado aún) podría indicar que la frutilla blanca posee un modelo de acumulación de metabolitos secundarios distinto al observado por diferentes autores en frutilla roja (Aharoni y col, 2000; Cheng y col, 1991; Leone y col, 2006; Raab y col, 2006). De esta forma, podemos inferir que la diferencia detectada en la concentración de ácido cinámico entre ambas especies puede tener su origen en las diferencias del patrón de expresión de la enzima PAL isoforma 1, principal responsable de la síntesis de este compuesto desde fenilalanina.

Si bien la producción de pigmentos está regulada en una fase posterior a la acción de la enzima PAL (Lunkenbein y col, 2006a), la disponibilidad del sustrato (ácido cinámico) producida por esta diferencia en la abundancia del mRNA para la síntesis de la enzima PAL presenta un desbalance interesante de estudiar entre ambas especies de frutilla.

En el caso del gen para la enzima GT, también se obtuvo un comportamiento de expresión similar al descrito por Lunkenbein y col (2006b) para frutilla roja lo cual es un aumento paulatino de la expresión durante el desarrollo del fruto. Sin embargo, en frutilla blanca se observa una alta expresión desde estadíos tempranos de desarrollo, lo cual es idéntico a lo observado para el gen de la vía paralela, CCoL. Según estos resultados no existe preferencia a nivel de expresión génica entre una vía u otra en

frutilla blanca lo cual se correlaciona con lo descrito para frutilla roja por los autores mencionados, quienes además tampoco observaron preferencia a nivel de actividad enzimática. Esta 'doble ruta' para la síntesis de los compuestos aromáticos etil y metil ester de cinamato potenciaría su producción, tal como se ha observado en diferentes trabajos a nivel de detección de los compuestos en ambas especies de frutilla (Aharoni y col, 2000; Cheng y col, 1991; Leone y col, 2006; Raab y col, 2006). Sin embargo, existe un desbalance de sustrato entre ambas especies pues se detecta una concentración diferencial de ácido cinámico, por lo cual se propone realizar nuevos estudios para cuantificar la diferencia entre los metabolitos intermedios y los productos de las rutas descritas entre ambas especies de frutilla, a fin de obtener la descripción completa de estos procesos de biosíntesis y su cinética.

CONCLUSIONES

Se logró cumplir el objetivo principal de este trabajo al identificar y estudiar una ruta metabólica que puede estar relacionada con la biosíntesis del compuesto nonadienol en frutilla blanca. Cada gen de esta ruta pudo ser amplificado desde cDNA de los distintos estadios de desarrollo del fruto tanto en frutilla blanca como en frutilla roja y se comprobó la identidad de los transcritos mediante secuenciación. Las diferencias en la expresión relativa observadas por PCR en tiempo real, nos permite concluir que existen diferencias durante el proceso de desarrollo del fruto, y que estas diferencias pueden liderar la diferencia en la biosíntesis del compuesto. Específicamente, se observó una mayor expresión relativa del gen codificante para la enzima LOX y HPL en frutilla blanca, lo cual podría estar directamente relacionado con la diferencia observada en el aroma de ambas especies en cuanto a la detección del compuesto

nonadienol. No se observó el mismo fenómeno a nivel de actividad enzimática de LOX, pero como se discutió, el ensayo no discrimina la acción de distintos tipos de LOX. Debido a ello, es necesario un ensayo más específico, tal como la detección y cuantificación de metabolitos mediante HPLC o GC-MS.

Un resultado importante fue que se logró identificar un gen no descrito con anterioridad en la familia Rosaceae, el gen de la enzima HPL en frutilla blanca. Gracias a la identificación y secuenciación de fragmentos de los extremos 5' y 3' realizada mediante reacción de RACE en el presente estudio, fue posible obtener la secuencia completa del gen en frutilla blanca, lo cual no solo es relevante para aumentar el conocimiento acerca de la estructura y clasificación de este gen, sino que también nos permitirá realizar experimentos de silenciamiento para finalmente comprobar si la ruta propuesta produce realmente el compuesto esperado.

Respecto del compuesto ácido cinámico, se proponen dos vías alternativas para la biosíntesis de derivados metil y etil esteres de cinamato en frutilla blanca, que serían compuestos de gran importancia a nivel organoléptico y que ya han sido descritos en frutilla roja. Según los resultados obtenidos, a nivel transcripcional no existen indicios de una preferencia por alguna de las vías en ninguna de las dos especies estudiadas, lo cual, junto a los resultados obtenidos en frutilla roja por Lunkenbein y col (2006b) y Aharoni y col (2000), nos permite deducir que ambas rutas son independientes, y en conjunto, potencian la producción de compuestos aromáticos derivados del ácido cinámico.

La diferencia observada en el perfil de expresión del gen de la enzima PAL isoforma 1 entre ambas especies, representa el inicio del desbalance metabólico que distingue el patrón de expresión de compuestos aromáticos derivados del ácido cinámico en cada

especie. Por lo anterior, se sugiere estudiar con mayor detalle los metabolitos involucrados en esta ruta, a fin de cuantificar las diferencias entre ambas especies de frutilla. Sin duda este desbalance sería una de las claves en el aroma de frutilla blanca respecto a frutilla roja.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F.B.** & Takeda, F. **1990**. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Sci. Hortic.* **42**:269-275.
- Adasme, C.**, Spiller, A. and Díaz, J. **2006**. Determinación de preferencias del consumidor de la región metropolitana hacia la frutilla blanca (*Fragaria chiloensis*). Un análisis conjunto y una prueba sensorial. *Economía Agraria.* **10**:1-10.
- Aharoni, A.**, Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M.M.L., De Vos, R.C.H., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen, A.J. and O'Connell, A.P. **2000**. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell.* **12**:647-661.
- Altschul, S.F.**, Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. **1990**. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**(3):403-10.
- Altschul, S.F.**, Madden, T.I., Shaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.D. **1997**. Gapped Blast and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Axelrod, B.**, Cheesbrough, T.M. and Laakso, S. **1981**. Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* **71**:441-451.
- Baldwin, E.A.**, Scott, J.W., Shewmaker, C.K. and Schuch, W. **2000**. Flavour trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience.* **35**:1013-1022.

- Becerra, V.,** Paredes, M., Romero, A. and Lavín, A. **2001.** Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agric. Téc. Chile.* **61**(4):413-428
- Bood, K.G. & Zabetakis, I. 2002.** The biosynthesis of strawberry flavour (II): biosynthetic and molecular biology studies. *J. Food Sci.* **67**:2-8.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of proteine dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Budavari, S. 2001.** The Merck Index, 13 Ed. Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ, USA.
- Buescher, R.H. and Buescher, R.W. 2001.** Production and stability of (E, Z)-2, 6-Nonadienal, the major flavor volatile of cucumbers. *Journal of Food Science.* **66**:357-361.
- Chang, S.,** Puryear, J. and Cairney, J. **1993.** A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep.* **11**:113-116.
- Cheng, G.W. and Breen, P.J. 1991.** Activity of phenylalanine ammonialyase(PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* **116**:865-869.
- Darrow, G.M. 1966.** The strawberry: history, breeding and physiology. Holt, Reinehart and Winston. New Cork, USA. pp 447.
- Douillard, C. & Guichard, E. 1990.** The aroma of strawberry (*Fragaria x ananassa*): characterization of some cultivars and influence of freezing. *J. Sci. Food Chem.* **29**:316-321.

- Galliard, T.** and Phillips, D.R. **2001.** Lipoxygenase from potato tubers: Partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. *Biochem. J.* **124**:431-438.
- González, M.,** Gaete-Eastman, C., Valdenegro, M., Figueroa, C.R., Fuentes, L., Herrera, R. and Moya-León, M.A. **2009.** Aroma development during ripening of *Fragaria chiloensis* fruit and participation of an alcohol acyltransferase (FcAAT1) gene. *J Agric Food Chem.* DOI **10.1021** / jf901693j.
- Grechkin, A.** **1998.** Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in lipid research.* **37**:317-352.
- Hancock, J.F.,** Lavín, A. and Retamales, J.B. **1999.** Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. *HortScience.* **34**:814-816.
- Jaakola, L.,** Pirttilä, A.M., Halonen, M. and Hohtola, A. **2001.** Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol. Biotechnol.* **19**:201-203.
- Kuroda, H.,** Kojima, H., Kaneda, H. and Takashi, M. **2005.** Characterization of 9-fatty acid hydroperoxide lyase-like activity in germinating barley seeds that transforms 9(S)-hydroperoxy-10(E),12(Z)-octadecadienoic acid into 2(E)-nonenal. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **69**(9):1661-1668.
- Larsen, M. & Poll, L.** **1992.** Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Z Lebensm Unters Forsch.* **195**:120-123.
- Latorre, M.,** Silva, H., Saba, J., Guziolowski, C., Vizoso, P., Martinez, V., Maldonado, J., Morales, A., Caroca, R., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., Gonzalez, M., Orellana, A., Retamales, J. and Meisel, L. **2006.** JUICE: a data management system which facilitates the analysis of large volumes of information in a EST project workflow. *BMC Bioinformatics.* **7**:513-524

- Lavín, A.**, Del Pozo, A. and Maureira, M. **2000**. Distribución actual de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. en Chile. Plant Genetic resources Newsletter, FAO. **122**:24-28.
- Leone, A.**, Bleve-Zacheo, T., Gerardi, C., Melillo, M.T., Leo, L. and Zacheo, G. **2006**. Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. J. Agric. Food. Chem. **54**(18):6835-44.
- Lewinshon, E.**, Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K., Amar, O., Lastoch Kin, E., Ravid, U., Gepstein, S. and Pichersky, E. **2001**. Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-Linalool by metabolic engineering of terpenoid pathway in tomato fruit. Plant Physiology. **127**:1256-1265.
- Lunkenbein, S.**, Coiner, H., Ric De Vos, C.H., Schaart, J.G., Boone, M.J., Krens, F.A., Schwab, W. and Salentijn, E.M.J. **2006a**. Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). J. Agric. Food Chem. **54**:2145-2153
- Lunkenbein, S.**, Bellido, M.L., Aharoni, A., Salentijn, E.M.J., Kaldenhoff, R., Coiner, H.A., Muñoz-Blanco, J. and Schwab, W. **2006b**. Cinnamate metabolism in ripening fruit: Characterization of an UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry (*Fragaria x ananassa*). Plant Physiology. **10.1104**:105.074955.
- Meisel, L.**, Fonseca, B., González, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., González, M., Orellana, A., Retamales, J. and Silva, H. **2005**. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. Biol. Res. **38**:83-88.
- Myers, M. J.**, P. Issenberg, and Wick, E.L. **1970**. L-leucine as a precursor of isoamyl alcohol and isoamyl acetate volatile aroma constituents of banana fruit discs. Phytochemistry. **9**:1693-1700.

- Noble, A.C. 1988.** Analysis of wine sensory properties. In: Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (Eds.). Wine analysis Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp 9-27.
- Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G. 1999.** Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. FEBS Letters. **443**:201-204.
- Pérez, A.G., Rios, J.J., Sanz, C., and Olias, J.M. 1992.** Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. J.Agric. Food Chem. **40**:2232-2235.
- Pyysalo, T., Honkanen, E., and Hirvi, T. 1979.** Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated strawberries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana. J.Agr. Food Chem. **27**:19-22.
- Raab, T., López-Ráez, J.A., Klein, D., Caballero, J.L., Moyano, E., Schwab, W. and Muñoz-Blanco, J. 2006.** FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. The Plant Cell. **18**:1023-1037.
- Sanz, C., Olias, J.M., and Pérez, A.G. 1997.** Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Tomas-Barberan, F.A. and Robins, R.J. (Eds.). Phytochemistry of fruits and vegetables. Clarendon Press, Oxford. pp 125-155.
- Schieberle, P. 1994.** Heat-induced changes in the most odour-active volatiles of strawberries. In: Maarse, H. and Van der Heij, D.J. (Eds.). Trends in Flavor Research. Elsevier, Amsterdam. pp 354-351.
- Schieberle, P. & Hoffmann, T. 1997.** Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurement and sensory studies on model mixtures. J.Agr. Food Chem. **45**:227-232.

- Schwartz, S.**, Qin X. and Zeevaart, J. **2001**. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**:25208-25211.
- Silva, E.**, Valdés, J., Holmes, D., Shmaryahu, A. and Valenzuela, P. **2006**. Generation and analysis of expressed sequence tags from *Botrytis cinerea*. *Biol Res*. **39**:367-376.
- Tressl, R.**, Holzer, M. and Apetz, M. **1975**. Biogenesis of volatiles in fruits and vegetables. In: Maarse, H. and Groenen, P.J. (Eds): *Aroma Research. Proc. Int. Symp. on Aroma Research*, Zeist, Netherlands. pp 41-62.
- Vizoso, P.**, Meisel, L.A., Tittarelli, A., Latorre, M., Saba, J., Caroca, R., Maldonado, J., Cambiazo, V., Campos-Vargas, R., Gonzalez, M., Orellana, A. and Silva, H. **2009**. Comparative EST transcript profiling of peach fruits under different post-harvest conditions reveals candidate genes associated with peach fruit quality. *BMC Genomics*. **10**:423-471.
- Wilhelm, S.** & Sagen, J. **1974**. A history of strawberry. University of California, Division of Agricultural Sciences. pp 297.
- Wyllie, S.G.**, Leach, D.N., Nonhebel, H.N. and Lusunzi, I. **1996**. Biochemical pathways for the formation of esters in ripening fruits. In: Taylor A.J., Mottram, D.S., editors. *Flavor science: Recent developments*. Cambridge: Royal Society of chemistry. pp 52-57.
- Yu, M. H.**, Olson L. E. and Salunkhe, D.K. **1968**. Production of 3-methylbutanal from L-leucine by tomato extract. *Plant Cell Physiol*. **9**:633-638.
- Zabetakis, I.** & Holden, M.A. **1997**. Strawberry flavor: Analysis and biosynthesis. *J.Sci. Food Agric*. **74**:421-434.