

Efecto del tratamiento postcosecha 1-MCP/CaCl₂ en la expresión de genes del metabolismo de la pared celular de frutilla

Langer S. ⁽¹⁾, Marina M. ⁽¹⁾, Civello M. ⁽²⁾, Martínez G. ⁽¹⁾, Villarreal N. ⁽¹⁾

(1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM).

(2) Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP).

Dirección de e-mail: silvilan@intech.gov.ar

Resumen

Debido a su textura delicada y velocidad elevada de ablandamiento, la frutilla, presenta una gran susceptibilidad al ataque por patógenos lo que reduce el tiempo de vida comercial de estos frutos. Por estos motivos, es de interés el desarrollo de tratamientos capaces de retrasar el desensamblaje de la pared celular, y el consecuente ablandamiento, durante la postcosecha de frutilla. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se halló que frutos tratados con 1-metilciclopropeno (1-MCP) y con CaCl₂ y almacenados 10 días a 4 °C y 2 días a 20 °C, eran más firmes, presentaban un mayor contenido tanto de pectinas unidas por interacciones débiles e iónicas, así como de hemicelulosas en sus paredes celulares y eran más resistentes al ataque por *Botrytis cinerea* que los frutos controles. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento 1-MCP/CaCl₂ sobre la expresión de genes vinculados con el metabolismo de los polímeros constituyentes de la pared celular de frutilla. Para ello se utilizaron 400 frutos del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial, los cuales se dividieron en 4 grupos: Control: 18 h aire, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; T1: 18 h aire, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C; T2: 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; y T3: 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C. Se tomaron muestras tanto inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, Ti) como luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (tiempo final, Tf). Mediante la técnica de PCR en Tiempo Real se midió la expresión de genes relevantes en el metabolismo de pectinas: poligalacturonasa (*FaPG1*) y pectin metilesterasa (*FaPME1*); y de hemicelulosas: xiloglucano endotransglicosilasa (*FaXTH1*) y xilosidasa (*FaXyl1*). Inmediatamente después de los tratamientos (Ti), se observó una expresión significativamente mayor de *FaPME1* y una expresión significativamente menor de *FaPG1* en los frutos T1, T2 y T3, respecto a los controles. Por otro lado, la expresión *FaXTH1* fue significativamente mayor en frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado, respecto al control. Es de destacar que estos efectos fueron más marcados en frutos sometidos a los tratamientos con 1-MCP (T2) y combinado (T3). Respecto al gen *FaXyl1* no se encontraron diferencias significativas en la expresión de mismo entre frutos tratados y controles. Estos resultados se encuentran estrechamente vinculados con el mayor contenido de pectinas de interacciones iónicas y débiles, así como de hemicelulosas registrados previamente.



Palabras clave: frutilla, postcosecha, genes, pared celular

Introducción

Por sus magníficas propiedades organolépticas, los frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch) son apreciados por los consumidores, tanto a nivel mundial como local, ya sea para consumo directo como para la elaboración de salsas, conservas, congelados, yogures, bebidas y helados (Holzwarh et al., 2012). El principal problema que presenta el manejo postcosecha de frutilla es la elevada velocidad de ablandamiento de los frutos, la cual conduce a un rápido deterioro que facilita el ataque por patógenos, dificulta el transporte y disminuye el tiempo de vida de estantería, causando elevadas pérdidas económicas. El ablandamiento o pérdida de firmeza de los frutos está estrechamente vinculado a modificaciones en la estructura y composición de la pared celular primaria. El modelo aceptado actualmente indica que la pared celular primaria está conformada por una red de celulosa - hemicelulosas embebida en una matriz de pectinas hidrofílica (Carpita y McCann, 2000). La pared celular primaria contiene un 35% de pectinas, 30% de celulosa, 30% de hemicelulosa y un 5% de proteínas estructurales y de modificación de polisacáridos, siendo el contenido de pectinas sustancialmente mayor en frutos carnosos, y alcanzó un 60% en frutilla (Brummell, 2006; Villarreal et al., 2016). Las pectinas además son los componentes mayoritarios de la lámina media estructura cuya función principal es de adhesión intercelular (Bou Daher y Braybrook, 2015).

Durante el desarrollo de los frutos carnosos, las pectinas (conformadas en su mayoría por homogalacturonanos o HG) son progresivamente de-esterificadas debido a la acción de pectin metilesterasas (PMEs), lo cual por un lado proporciona el sustrato a las poligalacturonasas (PGs), que hidrolizan los enlaces α -1,4-glucosídicos de los HG, y por otro facilita la formación de puentes de Ca^{+2} entre los residuos de ácidos galacturónicos desterificados otorgando estabilidad a la matriz péctica (Jarvis et al., 2003). Por estos motivos, y con el fin de retrasar el desensamblaje postcosecha de la pared celular de frutilla, resulta de interés el estudio e implementación de tratamientos capaces de aumentar la expresión y actividad de PMEs endógenas de frutilla y que disminuyan las correspondientes a otras enzimas que degradan los polímeros de la pared celular primaria y lámina media, como las PGs. En este sentido, nuestro grupo de investigación evaluó en un trabajo previo el efecto del tratamiento combinado 1-MCP/ CaCl_2 , así como los tratamientos individuales (1-MCP y CaCl_2) y control sobre la firmeza, el contenido de los polímeros principales de la pared celular de frutilla y sobre el crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales resultados obtenidos revelaron que luego de un almacenamiento durante 10 días a 4 °C y 2 días a 20 °C (tiempo final ó Tf), los frutos tratados con CaCl_2 , 1-MCP y combinado fueron significativamente más firmes que los frutos controles, presentaban un mayor contenido de hemicelulosas y de pectinas unidas por interacciones iónicas y débiles. Asimismo, frutos sometidos a los tratamientos individuales y combinado presentaron un crecimiento significativamente menor de *B. cinerea*, tanto en placas que contenían paredes celulares de los frutos a Tf como única fuente de carbono, como luego de ser inoculados con un micelio de *B. cinerea* y almacenados durante 6 días a 20 °C. Es importante destacar que los resultados observados tanto en la firmeza como en el menor crecimiento del hongo fueron más



pronunciados en los frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP y al tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos individuales CaCl₂ y 1-MCP y combinado, 1-MCP/CaCl₂, sobre la expresión de genes vinculados con el metabolismo de los polímeros constituyentes de la pared celular de frutilla. Respecto al metabolismo de pectinas, se evaluó la expresión de los genes *FaPME1* y *FaPG1*, que codifican para una pectin metilesterasa y una poligalacturonasa respectivamente, y en cuanto al metabolismo de hemicelulosas, se estudió la expresión de los genes *FaXTH1* y *FaXyl1*, que codifican correspondientemente, para una xiloglucano transglicosilasa/hidrolasa y una β-xilosidasa.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Se utilizaron aproximadamente 400 frutos de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.) del cultivar Aroma cosechados en estadio de madurez comercial (75-85% de coloración superficial roja) en la zona del Gran La Plata, Pcia. Bs. As. Los frutos se transportaron inmediatamente al laboratorio de forma refrigerada.

Tratamientos

Los frutos se seleccionaron de acuerdo a forma, tamaño y ausencia de daños, y para cada condición evaluada se utilizaron 120 frutos. Los tratamientos realizados fueron: Control (C): 18 h aire, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; Tratamiento 1 (T1): 18 h aire, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C; Tratamiento 2 (T2): 18 h 1-MPC 1 ppm, 20 °C + 30 min en agua, 25 °C; y Tratamiento 3 (T3): 18 h 1-MCP 1 ppm, 20 °C + 30 min en CaCl₂ 1% p/v, 25 °C. Se tomaron muestras tanto inmediatamente después de los tratamientos (tiempo inicial, Ti) como luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (tiempo final, Tf). Para cada tiempo, los frutos se cuartearon, congelaron en N₂ (l) y almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Extracción de ARN_T y síntesis de ADN_C

A partir de 5 g de pulverizado de frutos tratados y controles se extrajo ARN total (ARN_T, 5 extracciones independientes) para todas las condiciones analizadas, utilizando el método del 2-butoxietanol (Manning, 1991). Luego de comprobar la integridad de ARN_T extraído mediante electroforesis en geles de agarosa y de proceder a la cuantificación de las muestras, se trató con ADNasa con el objetivo de obtener ARN libre de ADN genómico. Posteriormente se purificó el ARN_T y se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADN_C).

Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real

Para cada condición evaluada, se analizó la expresión relativa mediante PCR en tiempo Real de cuatro genes vinculados con el metabolismo de pared celular de frutilla. En la *Tabla 1* se detallan los números de acceso a las secuencias de los genes, secuencias



de los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del amplicón en pares de bases (pb). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo utilizando FastStart Universal SYBR Green Master Rox 2X (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en un equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s; y una curva de disociación de 60 °C a 95 °C con incrementos de 0,3 °C. Se construyeron las correspondientes curvas de eficiencia para cada par de oligonucleótidos utilizado, empleando ADNc de frutos 100% rojos como molde. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado y se incluyó agua como control negativo en cada corrida. Se midió fluorescencia al final de cada paso de amplificación. En cada experimento, los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco réplicas biológicas, normalizadas contra el gen de referencia *FaGaPDH1*, el cual codifica una gliceraldehído fosfato deshidrogenasa de frutilla (número de acceso: AB363963.1). Para la amplificación de *FaGaPDH1* se utilizaron los siguientes cebadores específicos: Fw: 5'-TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3' y Rv: 5'-AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG-3', y el tamaño del fragmento amplificado fue de 96 pb. Los niveles de expresión se calcularon mediante el método de las dos curvas estándares (Pfaffl, 2001)

Tabla 1.

Genes del metabolismo de pared celular	Número de acceso	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño amplicón (pb)
Pectinas			
<i>FaPME1</i>	AY324809	Fw: 5' CAAGTGCACCCAACTTCTGA 3', Rv: 5' CTGAGCTACCACAACGTCCA 3'	123
<i>FaPG1</i>	DQ458990	Fw: 5' AATGTGAGATTTCGACAGAGTG- 3' Rv: 5' GTGGAAATTTTTGCTGTTAAGTG 3'	72
Hemicelulosas			
<i>FaXTH1</i>	GQ367550	Fw: 5' ACTCTGCTCTTGAGCATAGTGC 3' Rv: 5' GAGCTGAATCTCATTGCCACC 3'	150
<i>FaXyl1</i>	EU736110	Fw: 5' TGCTACCAGAGATCGACGTG3' Rv: 5' CAACACCGGCATAGTTTCCT3'	274

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA, y las medias comparadas mediante el test de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0,05$. Se utilizó el Graph-PadPrism versión



5. (GraPhPad, San Diego, CA, USA) para generar los gráficos de expresión relativa en función de las condiciones evaluadas.

Resultados y Discusión

Expresión de genes del metabolismo de pectinas

El gen *FaPME1* codifica para la pectin metilesterasa 1 (EC 3.1.1.11) y su expresión es específica de fruto (Castillejo et al., 2004). Se ha demostrado que este gen es relevante en el metabolismo de pectinas de frutilla (Osorio et al., 2008). En este sentido, fue informado que la expresión ectópica *FaPME1* en la frutilla silvestre *Fragaria vesca*, da lugar a frutos con una pared celular con pectinas cuyos oligogalacturónidos poseen un menor grado de metil-esterificación (Osorio et al., 2008). En un estudio sobre el efecto del etileno sobre la regulación bioquímica y fisiológica de frutos de frutilla (cv. Toyonoka) cosechados en el estadio de maduración blanco, se reportó una mayor acumulación de ARNm *FaPME1* en frutos tratados con 1-MCP (Villarreal et al., 2016). Por otra parte, frutos de *Fragaria chiloensis* 75-85% rojos presentaron mayor expresión *FaPME1* luego de ser sumergidos en una solución de CaCl_2 2% p/v y almacenadas durante 8 días a 2 °C y 48 h a 20 °C (Figuroa et al., 2012). En el presente trabajo, se observó una expresión significativamente mayor de *FaPME1* en frutos T1, T2 y T3 respecto a los frutos controles a Ti; **Figura 1.A.**); siendo más pronunciado dicho aumento en los frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP (T2) y combinado (T3). Luego de un almacenamiento de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (Tf); la expresión *FaPME1* disminuyó y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**Figura 1.A.**).

El gen *FaPG1* codifica una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) íntimamente vinculada con la degradación de pectinas y con las diferencias de texturas observadas entre cultivares de frutilla (Villarreal et al., 2008; Quesada et al., 2009). Se informó una regulación negativa de la expresión relativa *PG* en frutos de papaya (Zerpa-Cantanhó et al., 2017) y menor actividad *PG* en frutos de mango (Razzaq Kashif et al., 2016) sometidos a la aplicación de 1-MCP. En frutilla, se ha reportado que la inhibición de la percepción del etileno en frutos blancos, tratados con 1-MCP y almacenados durante 48 h a 22 °C, genera una disminución significativa de la expresión *FaPG1* y de la actividad *PG*, respecto a los frutos no tratados (Villarreal et al., 2009, Villarreal et al., 2016). En el presente trabajo, se observó una expresión significativamente menor del gen *FaPG1* en frutos cosechados en estadio comercial y sometidos a los tratamientos T1, T2 y T3 respecto al control inmediatamente después de cada tratamiento (**Figura 1.B**). Luego del almacenamiento, la expresión *PG* disminuyó significativamente respecto a Ti, y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**Figura 1.B**).

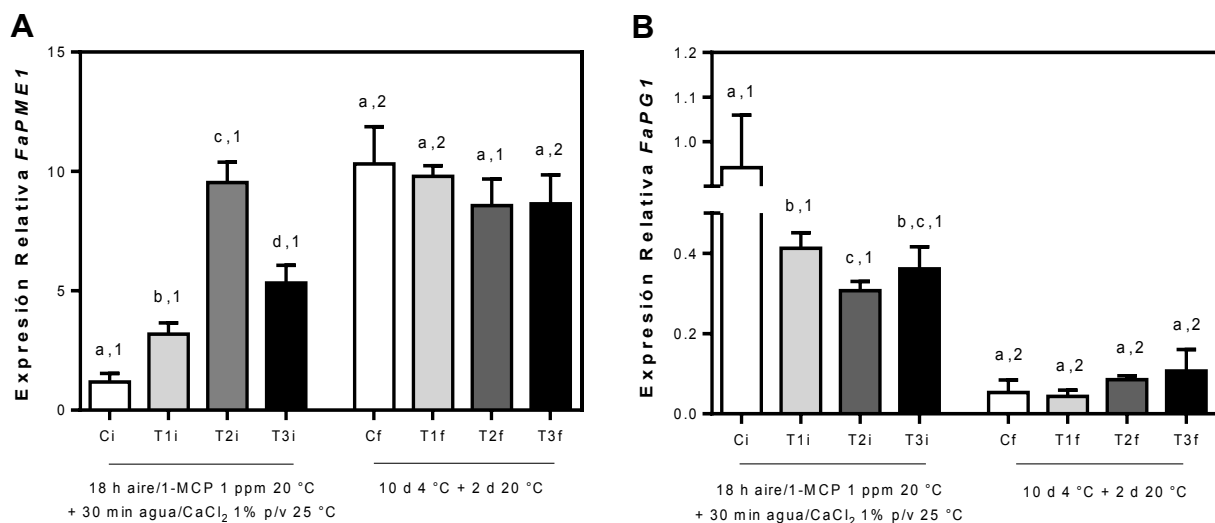


Figura 1. Expresión relativa de **A) FaPME1** y **B) FaPG1** en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl₂ (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/CaCl₂ (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Expresión de genes de metabolismo de hemicelulosas

Las xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTHs) son enzimas involucradas en el remodelado de las hemicelulosas de la pared celular vegetal. Los genes XTH codifican proteínas que pueden tener dos tipos de actividades catalíticas de acuerdo a sus efectos sobre los xiloglucanos de la pared celular, xiloglucano endo-transglicosilasa (XET; EC 2.4.1.207) y xiloglucano endo-hidrolasa (XEH; EC 3.2.151) (Eklof y Brumer, 2010). Se ha sugerido que el gen *FaXTH1* codifica una enzima putativa con actividad endo-transglicosilasa exclusivamente, con lo cual se la ha asociado con el ensamblado y mantenimiento, en vez del desensamblaje de estos polímeros (Nardi et al., 2014). Villarreal et al., (2016) reportaron un aumento en la expresión *FaXTH1* en frutos en estadio blanco tratados con 1-MCP y almacenados 48 h a 22 °C. Por otro lado, se informó que no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa *XTH1* entre frutos de *Fragaria chiloensis* controles y frutos sumergidas en una solución de CaCl₂ y luego almacenadas durante 8 días a 2 °C y 48 h a 20 °C (Figuroa et al., 2012). En el presente trabajo, inmediatamente después de los tratamientos, tanto los frutos sometidos a los tratamientos individuales (T1 y T2) como al combinado (T3) mostraron un aumento significativo en la expresión del gen *FaXTH1* (**Figura 3.A**) respecto a frutos controles, siendo este efecto más marcado en frutos T2 y T3. A tiempo final, la expresión de este gen aumenta significativamente en frutos controles, aunque continúa siendo menor que en frutos sometidos al tratamiento combinado (**Figura 3.A**).

El gen *FaXyl1* codifica para una β -D-xilosidasa (EC 3.2.1.37) que está vinculada a diferencias en la firmeza entre cultivares de frutilla (Bustamante et al., 2006). Se reportó que frutillas (cv. Camarosa) en estadio blanco, tratadas con 1-MCP y luego almacenadas durante 48 h a 20 °C, presentaron una mayor acumulación de



transcriptos *FaXyl1*, aunque no se observaron diferencias en la actividad β -Xyl entre tratados y controles (Bustamante et al., 2009). En el presente trabajo, no se hallaron diferencias significativas en la expresión *FaXyl1* entre frutos tratados y controles, en ninguno de los dos tiempos analizados (**Figura 3.B**).

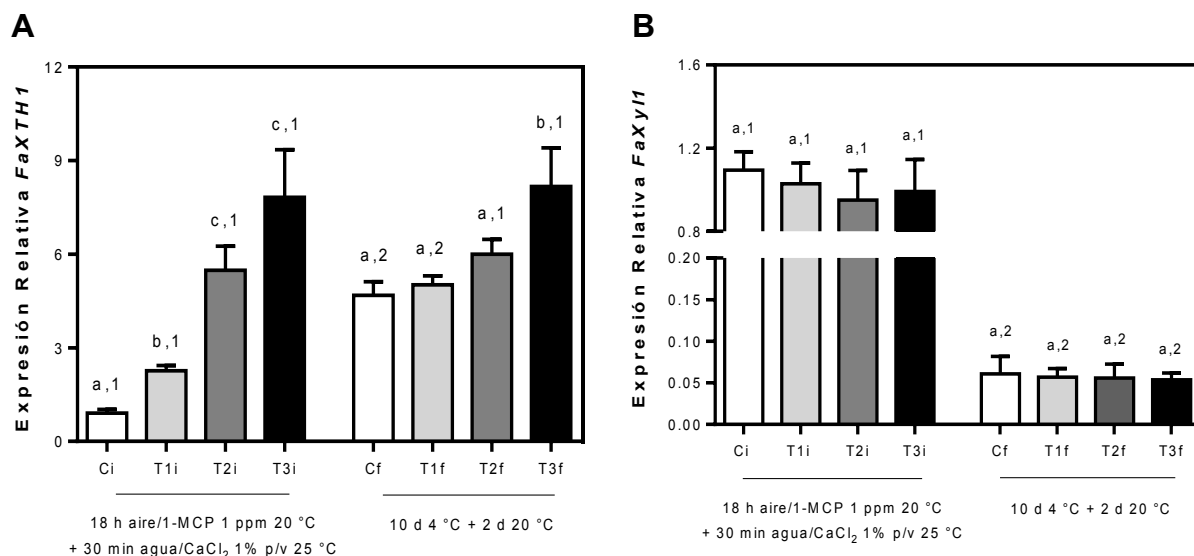


Figura 2. Expresión relativa de **A)** *FaXTH1* y **B)** *FaXyl1* en muestras de frutos control (C), tratados con CaCl_2 (T1), tratamiento con 1-MCP (T2) y tratamiento combinado 1-MCP/ CaCl_2 (T3) a tiempo inicial (Ti) y tiempo final (Tf). Las barras indican desviaciones estándar del promedio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo tiempo de incubación (Ti o Tf). Números diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de incubación (Ti o Tf) para un mismo tratamiento ($p \leq 0,05$).

Conclusiones

La mayor firmeza y el mayor contenido de hemicelulosas y pectinas unidas por interacciones iónicas y débiles observados en frutos sometidos al tratamiento CaCl_2 y particularmente, a los tratamientos 1-MCP y combinado, respecto a los controles, se debe en parte a la regulación positiva de genes tales como *FaPME1* y *FaXTH1*, y la disminución de la expresión de genes de degradación como *FaPG1*.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través de subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET; PIP 2013-2015 N° 0440) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; Préstamo BID PICT 2012-1562) Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por José Luis Burgos (Técnico CIC).



Referencias

- BOU DAHER F. BRAYBROOK S. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion, en *Frontiers in Plant Science*. 6: 523.
- BRUMMELL D. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit, en *Functional Plant Biology*, 33:103 -119.
- BUSTAMANTE C., ROSLI H., AÑÓN M., CIVELLO P., MARTÍNEZ G. (2006). β -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene y analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness, en *Plant Science*, 171:497–504.
- BUSTAMANTE C., CIVELLO P., MARTÍNEZ G. (2009). Cloning of the promoter region of Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit, en *Plant Science* 177:49–56.
- CARPITA N., MCCANN M. (2000). The cell wall. Biochemistry and molecular biology of plants. Eds. BB Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones. 52-108.
- CASTILLEJO C., DELA FUENTE J., IANNETTA P., BOTELLA M., VALPUESTA V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of *FaPE1* a ripening-specific isoform, en *Journal of Experimental Botany*, 55:909–918.
- ZERPA-CATANHO D., ESQUIVEL P., MORA-NEWCORDER E., SÁENZ M., HERRERA R., JIMÉNEZ V. (2017). Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. 'Pococi' hybrid) en, *Postharvest Biology y Technology*, 125:42–51.
- EKLOF J., BRUMER, H. (2010). The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodelling. en: *Plant Physiology* 153:456-466.
- FIGUEROA C., OPAZO M., VERA P., ARRIAGADA O., DÍAZ M., MOYA-LEÓN M. (2012). Effect of postharvest treatment of calcium y auxin on cell wall composition y expression of cell wall-modifying genes in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit, en *Food Chemistry*, 132:2014–2022.
- HOLZWARH M., KORHUMMEL S., CARLE R., KAMMERER D. (2012). Evaluation of the effects of different freezing y thawing methods on color, polyphenol y scorbic acid retention in strawberries (*Fragaria x ananassa*, Duch.), en *Food Research International* 48:241-248.
- JARVIS M., BRIGGS S., KNOX J. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants, en *Plant, Cell y Environment*, 26:977-989.
- MANNING K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation, en: *Analytical Biochemistry*, 195:45-50.
- NARDI C., VILLARREAL N., OPAZO C., MARTÍNEZ G., MOYA-LEÓN M., CIVELLO M. (2014). Expression of *FaXTH1* y *FaXTH2* genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions y effect of plant growth regulators, en *Scientia Horticulturae*, 165:111–122.



OSORIO S., CASTILLEJO C., QUESADA M.A. (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*), en *Plant Journal*, 54:43-55.

QUESADA M., BLANCO-PORTALES R., POSE S. (2009). Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening, en *Plant Physiology*, 150:1022-1032.

VILLARREAL N., MARTÍNEZ G., CIVELLO P. (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit, en *Plant Science*, 176:749-757.

VILLARREAL N., MARINA M., NARDI C., CIVELLO M., MARTÍNEZ G. (2016). Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism, en *Plant Science*, 252:1–11.