

Tesis para optar al título de Doctora en Biología Molecular y
Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)

**“Análisis del efecto de tratamientos postcosecha en el
metabolismo de la pared celular de frutilla y su relación
con respuestas de defensa del fruto”**

Lic. Silvia Estefanía Langer

Directora: Dra. Natalia M. Villarreal

Co-director: Dr. Pedro Marcos Civello



I N T E C H

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi directora Naty, quien me guió para el desarrollo de la Tesis y me brindó su ayuda en el trabajo de mesada, enseñándome a la par con entusiasmo y dedicación. Agradecerle por haberme transmitido sus conocimientos, formándome con excelencia académica y haciéndome sentir confianza en mí misma. Su predisposición y energía hizo posible que pudiésemos concretar nuestros proyectos, de los cuales estoy profundamente orgullosa y agradecida. En este largo proceso de la Tesis, no hubo nada más valioso para mí que sus consejos y su apoyo aun en los tiempos complicados, académicos y personales.

También quiero agradecer a mi co-director Marcos, primero por permitirme realizar este trabajo en su entorno. Gracias a él conocí a Gustavo y luego al laboratorio UBFrutos en el INTECH. Quiero agradecerle por sus aportes inestimables, siempre atento a mis ideas y por su apoyo incondicional ante muchas situaciones. Me brindó respuestas con la serenidad que lo caracteriza y que tanto hace falta en los momentos bulliciosos.

Quiero agradecerles a María y a Gustavo, por aportar sus conocimientos académicos tan valiosos. A Naty, Marcos, María y Gustavo, muchas gracias por la revisión del presente manuscrito, por su respaldo y por permitirme ser parte de tan hermoso grupo de trabajo. Fue un orgullo haber sido formada por excelentes profesionales y de calidad personal.

A José por su asistencia en los ensayos de laboratorio, por su buen humor y compartir charlas en las jornadas extensas. A Mailén, quien fue una compañía muy agradable. A ambos también los estimo mucho.

A Vanina, Sofía, Marcela, Martha, Victoria, y otras colegas de doctorado, por su amistad y su ayuda, y porque la vida en Chascomús brilló mucho más con sus encuentros. También a Juan Pedro, siempre inquieto y dispuesto a ayudar.

A todo el personal del INTECH: investigadores, directores, ministros de instrumentación, personal de limpieza, de seguridad y de administración, todos ellos hacen el Instituto que me albergó y del que tan feliz estoy de haber pertenecido.

A mis amigas de la UNLP, Luciana, Sofía, Gisela y Jazmín, a quienes veo ocasionalmente, pero aquellos son momentos felices, y saber que están presentes me hace sentir más segura.

Quiero agradecer a mi mamá, quien hizo y sigue haciendo mi vida más linda, más fácil y siempre con todo el amor y sabiduría que sobran en ella. Su respaldo incondicional, su alegría, y sus palabras son inspiración para alcanzar mis metas. A mi papá, porque también hace todo

el esfuerzo para que esté bien y sea feliz. A mi hermano, por su ayuda, y su presencia siempre cuando lo necesité. A los tres, gracias por su apoyo, son mi orgullo.

A mis abuelas, Marta y Gloria, a mis tías, Lupe y Patricia.

A Lara y a Moro.

Mis últimos agradecimientos son a Sasha, quien cambió mi vida y me hace sentir la persona con más suerte en el mundo. A Nina y a Sophia, por alegrar mis días. A Astrid por hacer que mi vida tenga un nuevo significado e importancia, por verla crecer feliz.

A todos ellos muchos gracias,

Silvia

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis doctoral se publicaron en revistas internacionales indexadas con referato (todas ellas pertenecientes al primer cuartilo dentro del área del estudio) y en libros de Actas de congresos.

Publicaciones directamente vinculadas con el trabajo de Tesis

Revistas

1) **“New insights into the cell wall preservation by 1-methylcyclopropene treatment in harvest-ripe strawberry fruit”**. Silvia E. Langer, María Marina, Paola Francese, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez, Natalia M. Villarreal. **2022**. *Scientia Horticulturae* (H index: 112), 299, 111032. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111032>.

2) **“Expression profiling of endo-xylanases during ripening of strawberry cultivars with contrasting softening rates. Influence of postharvest and hormonal treatments”**. Mailén Hirsch*, **Silvia Langer***, María Marina, Hernán Rosli, Marcos Civello, Gustavo Martínez, Natalia Villarreal. *: ambas autoras contribuyeron de igual manera. **2021**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (H index: 131) 101, 3676-3684. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10997>.

3) **“Calcium chloride treatment modifies cell wall metabolism and activates defense responses in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch)”**. **Silvia E. Langer**, María Marina, José L. Burgos, Gustavo A. Martínez, Pedro M. Civello, Natalia M. Villarreal. **2019**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (H index: 131) 99, 4003-4010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9626>.

4) **“Effects of heat treatment on enzyme activity and expression of key genes controlling cell wall remodeling in strawberry fruit”**. **Silvia E. Langer**, Natalia C. Oviedo, María Marina, José Luis Burgos, Gustavo A. Martínez, Pedro M. Civello, Natalia M. Villarreal 2018. *Plant Physiology and Biochemistry* (H index: 113) 130, 334-344. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.07.015>.

Trabajos en preparación

“Biochemical and molecular aspects associated with defense enhancement by heat treatment in harvest-ripe strawberries”. **Silvia E. Langer**, María Marina, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez, Natalia M. Villarreal.

Trabajos Completos publicados en Libros de Actas de Congreso

- 1) “El tratamiento térmico/CaCl₂ modula el metabolismo de la pared celular durante la postcosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.)”.** Silvia E. Langer, María Marina, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez, Natalia M. Villarreal. Trabajo Completo publicado en el CD del XVI Congreso Cytal - Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología, Mar del Plata (18-20/09/2017).
- 2) “Efecto del tratamiento postcosecha 1-MCP/CaCl₂ en la expresión de genes del metabolismo de la pared celular de frutilla”.** Langer S., Marina M., Civello M., Martínez G., Villarreal N. Trabajo Completo publicado en el Libro de Actas del I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha - IX Jornada Argentina de Biología y Tecnología Poscosecha. Concordia, Entre Ríos (25-27/10/2017). ISBN: 978-950-698-437-3.
- 3) Efecto del tratamiento combinado (1-metilciclopropeno/CaCl₂) en parámetros de calidad poscosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch)”.** Francese P., Langer S., Marina M., Civello P., Martínez G., Villarreal N. Trabajo Completo publicado en el Libro de Actas del I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha - IX Jornada Argentina de Biología y Tecnología Poscosecha. Concordia, Entre Ríos (25-27/10/2017). ISBN: 978-950-698-437-3.

Resúmenes publicados en Libros de Actas de Congreso

- 1) “El tratamiento combinado 1-metilciclopropeno (1-MCP)/CaCl₂ modula el metabolismo de la pared celular de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch) y preserva la calidad de los frutos”.** Langer Silvia, Marina María, Civello Pedro, Martínez Gustavo, Villarreal Natalia. (13-16/11/2016). XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV), Corrientes, Argentina. ISBN: 978-987-3619-17-5.
- 2) “El tratamiento térmico preserva la estructura de la pared celular de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch) a través de la modificación de patrones de expresión de genes claves y actividades enzimáticas en el metabolismo de pectinas y hemicelulosas”.** Langer S., Marina M., Martínez G., Civello P., Villarreal N. (11-15/11/2018). XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal - XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal (RAFV), Córdoba. ISBN: 978-987-778-346-9.
- 3) “Endoxilanasas en frutilla: Estudios de los perfiles de expresión durante la maduración, tratamientos hormonales y postcosecha”.** Hirsch M., Langer S., Marina M., Rosli H., Civello P., Martínez G., Villarreal N. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. “Nuevas Evidencias y Cambios de Paradigmas en Ciencias Biológicas”. 9, 10, 11,

14 y 15/09/2020. Publicado con referato en el Libro digital.
<https://www.sbr.org.ar/Site/index.php/congreso/libros-de-resumenes>

4) “El tratamiento postcosecha con CaCl₂ modula el metabolismo de pectinas de la pared celular y lámina media de frutilla preservando la firmeza de los frutos”. Langer S., Marina M., Civello P., Martínez G., Villarreal N. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. “Nuevas Evidencias y Cambios de Paradigmas en Ciencias Biológicas”. 9, 10, 11, 14 y 15/09/2020. Publicado con referato en el Libro digital.
<https://www.sbr.org.ar/Site/index.php/congreso/libros-de-resumenes>

5) “El tratamiento térmico activa respuestas clásicas de defensa durante la postcosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch.)”. Langer S., Marina M., Civello P., Martínez G., Villarreal N. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. “Nuevas Evidencias y Cambios de Paradigmas en Ciencias Biológicas”. 9, 10, 11, 14 y 15/09/2020. Publicado con referato en el Libro digital.
<https://www.sbr.org.ar/Site/index.php/congreso/libros-de-resumenes>

6) “Efecto del tratamiento con CaCl₂ en la expresión de genes de defensa durante la postcosecha de frutilla”. Langer Silvia, Marina María, Civello Pedro, Martínez Gustavo, Villarreal Natalia. III Congreso Argentino de Biología y Tecnología Postcosecha. 26-30/07/2021. Publicado con referato en el Libro de Resúmenes. Página 72. El trabajo fue seleccionado además para su presentación en forma oral (Código A1-26).

Publicaciones no vinculadas directamente con el trabajo de Tesis

Revistas

1) “*Burkholderia* sp. Strain AU4i promotes *Arabidopsis* growth and increases plant defence response to necrotrophic pathogens”. María Belén Colavolpe, Natalia Marina Villarreal, Silvia Estefanía Langer, Fernando Matías Romero, Gustavo Adolfo Martínez, Adesh Saini, Oscar Adolfo Ruíz, María Marina. 2020. *Journal of Plant Growth Regulation* (H index: 76). <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10238-6>.

Trabajos en Eventos Científico-Tecnológicos no Publicados

1) “Respuesta de genes y enzimas de defensa a la inhibición de la percepción de etileno en frutilla”. Silvia Langer, María Marina, Pedro Civello, Gustavo Martínez, Natalia Villarreal. (16-19/05/2017). Simposio de Genómica Funcional de Plantas, Rosario, Argentina.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	10
ABSTRACT	14
2. INTRODUCCIÓN GENERAL	17
2.1. Generalidades de la frutilla y su maduración	18
2.1.1. Características generales del fruto de frutilla.....	18
2.1.2. Principales parámetros de calidad	18
2.1.3. Maduración de la frutilla	19
2.1.3.1. Regulación hormonal de la maduración.....	20
2.1.3.2. Cambios en el color.....	22
2.1.3.3. Cambios en el sabor	24
2.1.3.4. Cambios en la textura.....	25
2.2. Metabolismo de la pared celular primaria en frutos carnosos	25
2.2.1. Pared celular primaria	25
2.2.2. Polímeros de la pared celular primaria.....	26
2.2.3. Principales enzimas involucradas en el metabolismo de la pared celular.....	29
2.2.4. Cambios en la composición de la pared celular de frutos carnosos durante la maduración.....	34
2.2.4.1. Hidratación <i>in vitro</i> de paredes celulares	36
2.3. Respuestas de defensa en frutilla.....	37
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	44
3.1. Hipótesis	44
3.2. Objetivo General y Específicos	44
3.2.1. Objetivo general	44
3.2.2. Objetivos particulares	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1. Material vegetal	45
4.2. Tratamientos postcosecha.....	45
4.3. Firmeza	46
4.4. Contenido de antocianinas	47
4.5. Pérdida de peso fresco y evaluación de podredumbres	47
4.6. pH y acidez titulable	47
4.7. Ensayo de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	48
4.8. Azúcares totales	48

4.9. Compuestos fenólicos.....	48
4.10. Aislamiento de los polisacáridos de pared celular.....	49
4.10.1. Pared celular.....	49
4.10.2. Pectinas totales.....	49
4.10.3. Contenido de las fracciones de pectinas, hemicelulosas y celulosa.....	50
4.10.4. Azúcares neutros.....	51
4.11. Hidratación <i>in vitro</i> de las paredes celulares.....	51
4.12. Grado de esterificación.....	51
4.13. Actividad total de enzimas involucradas en el metabolismo de pared celular.....	52
4.13.1. Pectin metilesterasa.....	52
4.13.2. Poligalacturonasa.....	52
4.13.3. β -D-xilosidasa y β -galactosidasa.....	53
4.13.4. α -L-Arabinofuranosidasa.....	53
4.14. Actividad total de enzimas vinculadas con respuestas de defensa.....	54
4.14.1. Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	54
4.14.2. Quitinasa.....	54
4.14.3. β -1,3-glucanasa.....	54
4.14.4. Polifenoloxidasa (PPO).....	55
4.14.5. Peroxidasa (POD).....	55
4.15. Expresión relativa por ensayos de PCR en Tiempo Real.....	55
4.15.1. Extracción de ARN total.....	55
4.15.2. Verificación de la integridad del ARN total.....	57
4.15.3. Cuantificación del ARN total extraído.....	57
4.15.4. Tratamiento con ADNasa y posterior purificación.....	58
4.15.5. Síntesis de ADN complementario.....	58
4.15.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR control).....	58
4.15.7. Visualización de los productos de PCR.....	59
4.15.8. Análisis de la expresión relativa mediante PCR en Tiempo Real.....	59
4.16. Ensayo de crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	62
4.17. Análisis estadístico.....	63
5. CAPÍTULO I: TRATAMIENTO TÉRMICO.....	64
5.1. Introducción.....	64
5.2. Antecedentes.....	66
5.2.1. Firmeza, antocianinas, pérdida de peso fresco, pH y acidez titulable.....	67

5.2.2. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> y desarrollo de podredumbres	69
5.3. Resultados.....	70
5.3.1. Parámetros de calidad del fruto.....	70
5.3.1.1 Azúcares y compuestos fenólicos	70
5.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla	71
5.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular	71
5.3.2.2. Hidratación <i>in vitro</i> de la pared celular	73
5.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresión relativa <i>FaPME</i> , <i>FaPG</i> y <i>FaPL</i>	75
5.3.2.4. Actividades β -Gal y α -Ara totales y expresión relativa <i>FaβGal</i> y <i>FaAra</i>	77
5.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa <i>FaXyl</i> , <i>FaXTH</i> , <i>FaExp</i> y <i>FaXyn</i>	80
5.3.3. Efecto del tratamiento térmico en respuestas de defensa de frutilla.....	82
5.3.3.1. Actividad PAL total y expresión relativa <i>FaPAL</i> y <i>FaCHS</i>	82
5.3.3.2. Actividades PPO y POD totales	83
5.3.3.3. Actividad quitinasa total y expresión relativa <i>FaChi</i>	84
5.3.3.4. Actividad β -1,3-glucanasa total y expresión relativa <i>FaβG2,3</i>	85
5.3.3.5. Expresión relativa <i>FaPR</i> y <i>FaPGIP</i>	85
5.4. Discusión	86
5.5. Conclusiones.....	95
6. CAPÍTULO II: TRATAMIENTO CON CaCl ₂	97
6.1. Introducción.....	97
6.2. Antecedentes.....	98
6.2.1. Firmeza y antocianinas	98
6.2.2. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	98
6.3. Resultados.....	99
6.3.1. Parámetros de calidad del fruto.....	99
6.3.1.1. Compuestos fenólicos	99
6.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla	100
6.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular	100
6.3.2.2. Hidratación <i>in vitro</i> de la pared celular	102
6.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresión relativa <i>FaPME</i> , <i>FaPG</i> y <i>FaPL</i>	103
6.3.2.4. Actividades β -Gal y α -Ara totales y expresión relativa <i>FaβGal</i> y <i>FaAra</i>	105
6.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa <i>FaXyl</i> , <i>FaXTH</i> , <i>FaExp</i> y <i>FaXyn</i> ..	107
6.3.3. Efecto del tratamiento con CaCl ₂ en respuestas de defensa de frutilla.....	109

6.3.3.1. Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	109
6.3.3.2. Actividad PAL total y expresión relativa <i>FaPAL</i> y <i>FaCHS2</i>	111
6.3.3.3. Actividades PPO y POD totales	112
6.3.3.4. Actividad quitinasa total y expresión relativa <i>FaChi</i>	113
6.3.3.5. Actividad β -1,3-glucanasa total y expresión relativa <i>FaβG2,3</i>	114
6.3.3.6. Expresión relativa <i>FaPR</i> y <i>FaPGIP</i>	114
6.4. Discusión	115
6.5. Conclusiones	118
7. CAPÍTULO III: TRATAMIENTO CON 1-MCP	119
7.1. Introducción	119
7.2. Antecedentes	120
7.2.1. Firmeza, antocianinas y pH	120
7.2.2. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	121
7.3. Resultados	121
7.3.1. Parámetros de calidad del fruto	121
7.3.1.1. Compuestos fenólicos	121
7.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla	122
7.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular	122
7.3.2.2. Hidratación <i>in vitro</i> de la pared celular	123
7.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresiones relativas <i>FaPME</i> , <i>FaPG</i> y <i>FaPL</i>	125
7.3.2.4. Actividades β -Gal y α -Ara totales y expresión relativa <i>FaβGal</i> y <i>FaAra</i>	126
7.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa <i>FaXyl</i> , <i>FaXTH</i> y <i>FaXyn</i>	128
7.3.3. Efecto del tratamiento con 1-MCP en respuestas de defensa de frutilla	129
7.3.3.1. Crecimiento <i>in vivo</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	129
7.3.3.2. Actividades PAL, POD, PPO, quitinasa y β -1,3-glucanasa totales	131
7.4. Discusión	133
7.5. Conclusiones	136
8. CONCLUSIÓN GENERAL	137
9. REFERENCIAS	138

1. RESUMEN

Los frutos de la frutilla comercial (*Fragaria x ananassa*, Duch.) son muy apreciados debido a sus propiedades organolépticas y calidad nutricional. Sin embargo, una vez cosechados, las frutillas sufren un rápido ablandamiento que conduce al daño mecánico y al incremento en la susceptibilidad al ataque por patógenos, reduciendo el tiempo de vida comercial de estos frutos. La modificación en la composición y estructura de los polímeros de la pared celular y lámina media contribuye principalmente a la pérdida de firmeza durante la maduración y almacenamiento de frutilla. La pared celular no solo determina la forma de las células y actúa como una barrera física efectiva contra patógenos, sino que también es una estructura dinámica capaz de cambiar su arquitectura y composición en respuesta a estímulos bióticos y abióticos. De esta manera, la implementación y el estudio de tratamientos capaces de retrasar el proceso de ablandamiento durante la postcosecha de frutilla, resultan de gran interés.

Como Antecedentes de la presente Tesis doctoral, en el Laboratorio se contaba con frutillas del cultivar Aroma cosechas en estadio de madurez comercial (80-90% de coloración superficial roja) y sometidas a los siguientes tratamientos postcosecha: 1) Tratamiento térmico: 3 h en aire, 45 °C, Control: 3 h en aire, 25 °C; 2) Tratamiento con CaCl₂: 0,5 h en una solución de CaCl₂ 1% p/v, 25 °C, Control: 0,5 h en agua destilada, 25 °C; y 3) Tratamiento con 1-MCP (1-metilciclopropeno): 10 h en 1-MPC 1 µl l⁻¹, 20 °C, Control: 10 h en aire, 20 °C. Para cada tratamiento, se tomaron muestras al día 0 (0d) y luego de un almacenamiento de 8 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (8+2d) para los tratamientos térmico y CaCl₂, y de 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (10+2d) para el tratamiento con 1-MCP. Se contaba, además, con una caracterización preliminar del efecto de los tratamientos en ciertos parámetros de calidad de los frutos, la cual evidenció que, en todos los casos, los frutos tratados fueron más firmes que los controles, y que las paredes celulares aisladas de frutos tratados eran menos susceptibles al crecimiento *in vitro* del patógeno *Botrytis cinerea* que las paredes de frutos controles. Asimismo, ninguno de los tratamientos modificó el pH ni la acidez titulable de las frutillas.

El presente Trabajo, tuvo como objetivos particulares, evaluar el efecto de los tratamientos térmico, CaCl₂ y 1-MCP en la composición de la pared celular, y en la actividad de enzimas y expresión de genes involucrados en el metabolismo de la pared de frutilla. Asimismo, se buscó caracterizar la influencia de dichos tratamientos en respuestas de defensa del fruto. Para ello, se completaron las medidas de parámetros de calidad (azúcares y compuestos fenólicos totales) de los frutos; se aislaron las paredes celulares, y se midió el

contenido de las mismas y de cada una de las fracciones poliméricas que forman parte de la pared. Se evaluó la hidratación *in vitro* de las paredes celulares y el grado de esterificación de pectinas totales. Asimismo, se midió la actividad total de las enzimas pectin metilesterasa (PME), poligalacturonasa (PG), β -galactosidasa (β -Gal), α -arabinofuranosidasa (α -Ara) y β -xilosidasa (β -Xil) y se analizó la expresión relativa por PCR en Tiempo Real de genes claves relacionados con el metabolismo de pectinas de cadena principal (*FaPME1*, *FaPG1*, *FaPLA*, *FaPLB* y *FaPLC*), la pérdida de cadenas laterales de pectinas (*Fa β Gal1*, *Fa β Gal4* y *FaAra1*) y el metabolismo de hemicelulosas (*FaXyl1*, *FaXTH1*, *FaXTH2*, *FaXynA*, *FaXynC*, *FaExp2* y *FaExp5*). Además, se evaluó el crecimiento *in vivo* de *B. cinerea* en frutos tratados y sus respectivos controles, así como la actividad total de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), peroxidasa (POD), quitinasa y β -1,3-glucanasa, y se estudió la influencia de los tratamientos en la expresión de los genes *FaPAL1*, *FaCHS2*, *FaChi2-2*, *FaChi3*, *Fa β G2,3*, *FaPR5* y *FaPGIP*, vinculados con mecanismos de defensa de frutilla.

Entre los resultados más relevantes, se observó un aumento del contenido de compuestos fenólicos en frutos sometidos a los tratamientos térmico y CaCl_2 , mientras que no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento 1-MCP y los controles.

Sólo el tratamiento térmico dio lugar a frutos con mayor contenido total de pared celular respecto a los controles. En cuanto al contenido polimérico de la pared, los tres tratamientos incrementaron el contenido de pectinas totales. Todos los tratamientos dieron lugar a frutos con un contenido significativamente mayor de pectinas unidas por interacciones iónicas (solubles en EDTA o PSE), y se observó un aumento menos pronunciado en el contenido de pectinas unidas por interacciones débiles (solubles en agua o PSA) comparado con los frutos no tratados. Asimismo, el tratamiento térmico dio lugar a frutos con un mayor contenido de pectinas unidas por interacciones covalentes (solubles en ácido clorhídrico o PSH). Los tratamientos con 1-MCP y térmico aumentaron el contenido de hemicelulosas; mientras que no se observaron diferencias en los frutos tratados con CaCl_2 respecto a los controles. Por otra parte, el contenido de azúcares neutros fue mayor tanto en frutos sometidos al tratamiento térmico como con CaCl_2 . Los resultados de los ensayos de hidratación *in vitro* de las paredes celulares, sugieren que el tratamiento térmico y 1-MCP son capaces de retrasar el colapso de la pared celular que se observa en frutos sobremaduros. Notablemente, los tres tratamientos inhibieron la actividad de una enzima clave en la degradación de pectinas como la PG y aumentaron significativamente la actividad PME (la cual permite la formación de puentes de calcio entre cadenas principales de pectinas adyacentes). La mayor actividad PME se correspondió con un menor grado de esterificación hallado en pectinas totales de frutos tratados y con un aumento en la expresión

relativa del gen *FaPME1*. Por otra parte, la expresión de genes claves en la degradación de pectinas (*FaPG1* y *FaPLC*) fue significativamente menor para los tres tratamientos. Los tratamientos térmico y CaCl_2 mostraron también una disminución de la expresión *FaPLB*.

Considerando la degradación de cadenas laterales de pectinas, la actividad β -Gal fue significativamente menor en los frutos tratados lo cual se asoció a una menor expresión de los genes *Fa β Gal1* (para el tratamiento CaCl_2) y *Fa β Gal4* (para los tratamientos térmico y 1-MCP). Aún más, los tratamientos térmico y 1-MCP disminuyeron la actividad α -Ara, y los tratamientos térmico y CaCl_2 regularon negativamente la expresión *FaAra1*. En frutos tratados térmicamente y con CaCl_2 , las menores actividades enzimáticas y expresiones de genes relacionados a la degradación de cadenas laterales se correlacionaría con el mayor contenido de azúcares neutros observados en frutos tratados.

En cuanto al metabolismo de hemicelulosas todos los tratamientos disminuyeron la actividad β -Xil, respecto a los controles. Tanto el tratamiento térmico como 1-MCP aumentaron significativamente la expresión *FaXTH1* y disminuyeron la correspondiente a *FaXTH2* (vinculadas con la remodelación y degradación de hemicelulosas, respectivamente). El tratamiento con CaCl_2 no modificó la expresión de *FaXTH1*, pero disminuyó las correspondientes a dos genes que codifican endoxilanasas putativas (*FaXynA* y *FaXynC*).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la preservación de la firmeza durante la postcosecha de frutillas sometidas a los tratamientos térmico, CaCl_2 y 1-MCP está estrechamente vinculada al mayor contenido e integridad de los polímeros que componen la pared celular como consecuencia del aumento de la actividad enzimática y expresión de genes relacionados al refuerzo de la pared (tales como *FaPME1* y *FaXTH1*), y a la disminución de la actividad de enzimas y expresión de genes claves en la degradación de pectinas y hemicelulosas (*FaPG1*, *FaPLC*, *Fa β Gal1*, *Fa β Gal4*, *FaAra1* y *FaXTH2*).

Respecto a los resultados vinculados con la defensa del fruto, los tratamientos térmico y CaCl_2 aumentaron las actividades totales PPO, POD, quitinasa y β -1,3-glucanasa, respecto a los controles, mientras que el tratamiento con 1-MCP aumentó las actividades PPO, POD y β -1,3-glucanasa. El tratamiento térmico aumentó de manera significativa la expresión de *FaPAL1*, *FaChi2-2*, *FaChi3*, *Fa β G2,3* y *FaPR5* a 0d. Luego del almacenamiento refrigerado y en estantería (8+2d), las expresiones *FaPAL1* y *FaCHS2* aumentaron en frutos tratados térmicamente respecto a los controles. Por otra parte, el tratamiento con CaCl_2 aumentó la expresión de los genes *FaChi2-2*, *FaChi3* y *Fa β G2,3* a 0d, y de *FaCHS2* a 8+2d. Se registró además un menor crecimiento *in vivo* de *B. cinerea* en frutos sometidos a los tratamientos con CaCl_2 y 1-MCP. Estos resultados evidencian que los tratamientos, térmico, CaCl_2 y 1-MCP son

capaces de activar respuestas de defensa a través del aumento de expresiones de genes y de actividades de enzimas clásicamente asociados con la protección del fruto contribuyendo a la inhibición de infecciones patogénicas durante el periodo de estantería. Asimismo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se discute el rol de las pectin metil esterasas en la generación de elicitores capaces de activar respuestas de defensa en frutilla.

Palabras clave: frutilla, tratamientos postcosecha, metabolismo de la pared celular, respuestas de defensa.

1. ABSTRACT

Commercial strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.) is highly appreciated due to its organoleptic properties and nutritional quality. However, once harvested, strawberry undergo rapid softening that leads to mechanical damage and increased susceptibility to attack by pathogens, reducing the shelf life of this fruit. The modification in the composition and structure of cell wall polymers and middle lamella is the main factor contributing to the loss of firmness during the ripening and storage of strawberry fruit. The cell wall not only determines the shape of cells and acts as an effective physical barrier against pathogens but is also a dynamic structure capable of changing its architecture and composition in response to biotic and abiotic stimuli. In this way, the implementation and study of treatments capable of delaying the softening process during strawberry postharvest are of great interest.

As the background of the present doctoral Thesis, strawberries from Aroma cultivar, harvested at a commercial ripening stage (80-90% of red surface coloration), were carried to the Laboratory and subjected to the following postharvest treatments: 1) Heat treatment: 3 h in air, 45 °C, Control: 3 h in air, 25 °C; 2) CaCl₂ treatment: 0.5 h in a 1% w/v CaCl₂ solution, 25 °C, Control: 0.5 h in distilled water, 25 °C; and 3) 1-MCP (1-methylcyclopropene) treatment: 10 h in 1-MPC 1 µl l⁻¹, 20 °C, Control: 10 h in air, 20 °C. For each treatment, samples were taken on day 0 (0d) and after storage for 8 days at 4 °C + 2 days at 20 °C (8+2d) for heat and CaCl₂ treatments, and for 10 days at 4 °C + 2 days at 20 °C (10+2d) for 1-MCP treatment. In addition, a preliminary characterization of the effect of the treatments on some quality parameters of the fruit was performed. In all cases, treated fruit was firmer than control, and isolated cell walls from treated fruit were less susceptible to *in vitro* growth of the pathogen *Botrytis cinerea* than control cell walls. In addition, none of the treatments modified the pH or titratable acidity of strawberry juice.

The particular objectives of the present work were to evaluate the effect of heat, CaCl₂, and 1-MPC treatments on the cell wall composition, as well as the activities of enzymes and the expression of genes involved in the strawberry cell wall metabolism. Furthermore, it was sought to characterize the influence of the treatments on fruit defense responses. For these purposes, fruit quality parameter measurements (total sugars and phenolic compounds) were completed. Cell walls were isolated, and the content of them and of each of the polymeric fractions that form part of the cell wall were measured. The *in vitro* cell wall swelling and the degree of total pectins esterification were evaluated. In addition, the total activity of the enzymes pectin methylesterase (PME), polygalacturonase (PG), β-galactosidase (β-Gal), α-

arabinofuranosidase (α -Ara), and β -xylosidase (β -Xil) were measured and the relative expression by Real-Time PCR of key genes related to the metabolism of main chain pectins (*FaPME1*, *FaPG1*, *FaPLA*, *FaPLB*, and *FaPLC*), the loss of pectin side chains (*Fa β Gal1*, *Fa β Gal4*, and *FaAra1*) and the metabolism of hemicelluloses (*FaXyl1*, *FaXTH1*, *FaXTH2*, *FaXynA*, and *FaXynC*) were analyzed. In addition, the *in vivo* growth of *B. cinerea* in treated fruits and their respective controls was evaluated, as well as the total activity of the enzymes phenylalanine ammonia lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), chitinase, and β -1,3-glucanase, and the influence of the treatments on the expression of the genes *FaPAL1*, *FaCHS2*, *FaChi2-2*, *FaChi3*, *Fa β G2,3*, *FaPR5* and *FaPGIP*, related to strawberry defense mechanisms, were studied.

Among the most relevant results, an increase in the phenolic total content was observed in fruits subjected to heat and CaCl₂ treatments, while no significant differences were observed between 1-MCP treatment and controls.

Only heat-treated fruit displayed a higher total cell wall content compared to control. Regarding the polymeric content of the cell wall, the three treatments increased the total pectin content. All treatments yielded fruit with a significantly higher content of pectins bound by ionic interactions (soluble in EDTA or PSE), and a less pronounced increase in the content of pectins bound by weak interactions (soluble in water or PSA) was noted compared to untreated fruit. Likewise, the heat treatment displayed fruit with a higher content of pectins linked by covalent interactions (soluble in hydrochloric acid or PSH). Heat and 1-MCP treatments increased the hemicelluloses content; while no differences were observed in the CaCl₂-treated fruit compared to controls. On the other hand, the content of neutral sugars was higher both in fruits subjected to heat treatment and with CaCl₂. The results of the *in vitro* cell wall swelling analysis suggest that both, heat and 1-MCP treatments, are capable of delaying the cell wall collapse, observed in overripe fruit. Remarkably, all three treatments inhibited the activity of a key pectin-degrading enzyme such as PG and significantly increased PME activity (which allows the calcium bridges formation between adjacent pectin backbones). The higher PME activity corresponded with a lower degree of esterification observed in total pectins from treated fruits and with an increase in the relative expression of *FaPME1* gene. On the other hand, the expression of key genes in the degradation of pectins (*FaPG1* and *FaPLC*) was significantly lower for the three treatments. Heat and CaCl₂ treatments also showed a decrease in *FaPLB* expression.

Considering the degradation of pectin side chains, the β -Gal activity was significantly lower in treated fruits, which was associated with a lower expression of the genes *Fa β Gal1* (for

the CaCl₂ treatment) and *FaβGal4* (for the heat and 1-MCP treatments). Furthermore, heat and 1-MCP treatments decreased α-Ara activity, and heat and CaCl₂ treatments negatively regulated *FaAra1* expression. In heat- and calcium-treated fruit, the lower enzymatic activities and gene expressions related to the degradation of side chains would correlate with the higher neutral sugars content observed in treated fruits.

Regarding the metabolism of hemicelluloses, all the treatments decreased the β-Xyl activity, compared to controls. Both heat and 1-MCP treatments significantly increased *FaXTH1* expression and decreased *FaXTH2* expression (associated with hemicellulose remodeling and degradation, respectively). Treatment with CaCl₂ did not modify the expression of *FaXTH1* but decreased those corresponding to two genes that encode putative endoxylanases (*FaXynA* and *FaXynC*).

Taken together, the results obtained suggest that the preservation of firmness during postharvest of strawberries subjected to heat, CaCl₂, and 1-MCP treatments is closely linked to the higher content and integrity of the polymers that compose the cell wall as a consequence of the increase in the enzymatic activity and expression of genes related to the reinforcement of the cell wall (such as *FaPME1* and *FaXTH1*), and to the decrease the activity of enzymes and expression of key genes involved in the degradation of pectins and hemicelluloses (*FaPG1*, *FaPLC*, *FaβGal1*, *FaβGal4*, *FaAra1*, and *FaXTH2*).

Regarding the results related to the defense of the fruit, heat and CaCl₂ treatments increased the total PPO, POD, chitinase, and β-1,3-glucanase activities, compared to the controls, while 1-MCP treatment increased the PPO, POD, and β-1,3-glucanase activities. Heat treatment significantly up-regulated *FaPAL1*, *FaChi2-2*, *FaChi3*, *FaβG2,3*, and *FaPR5* expressions at 0d. After cold + shelf storage (8+2d), *FaPAL1* and *FaCHS2* expressions increased in heat-treated fruits compared to controls. On the other hand, CaCl₂ treatment increased *FaChi2-2*, *FaChi3*, and *FaβG2,3* expressions at 0d, and *FaCHS2* expression at 8+2d. Additionally, an *in vivo* growth inhibition of *B. cinerea* was recorded in fruits subjected to CaCl₂ and 1-MCP treatments. These results show that heat, CaCl₂ and 1-MCP treatments are able to activate defense responses through the increase of gene expressions and enzyme activities classically associated with the fruit protection, contributing to the inhibition of pathogenic infections during the shelf period. Moreover, according to the results obtained, the role of pectin methylesterases in the generation of elicitors capable of activating defense responses in strawberry fruit is discussed.

Keywords: strawberry, postharvest treatments, cell wall metabolism, defense responses.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Por sus magníficas cualidades organolépticas (color, sabor, aroma y textura) y propiedades nutricionales (vitaminas y antioxidantes), los frutos de la frutilla comercial (*Fragaria x ananassa*, Duch.) son ampliamente demandados tanto para su consumo en fresco como para la elaboración de helados, mermeladas, saborizantes y reposterías.

Es un fruto apreciado por su alto contenido de antioxidantes entre los que se encuentra la vitamina C y compuestos fenólicos tales como los flavonoides, que incluyen a los flavonoles y antocianinas (Van de Velde y col., 2013). Las frutillas contienen además otros ácidos orgánicos, entre ellos el elágico, sustancia que se reportó como inhibitoria de la reproducción de células cancerígenas, anti mutagénico, y que contribuye a disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares y mejora la función endotelial vascular (Giampieri y col., 2012; Afrin y col., 2016). Por otro lado, posee bajos niveles de fructosa y glucosa por lo que es recomendado a personas diabéticas (Afrin y col., 2016).

Por los motivos mencionados, la frutilla representa un producto hortícola relevante en gran medida a nivel mundial. Argentina se encuentra en el tercer puesto respecto a la producción de frutilla en Sudamérica, cosechando un promedio de 45.500 toneladas anuales (Kirschbaum y col., 2017). Las principales zonas de producción se encuentran en las provincias de Santa Fe (Coronda), Tucumán (Lules), Buenos Aires (Mar del Plata y Pilar), Jujuy (Perico), Corrientes (Bella Vista) y Neuquén (Plottier) (Kirschbaum y col., 2017).

El principal factor que determina el tiempo de vida comercial de frutos de textura delicada como la frutilla, es el ablandamiento excesivo que se produce durante la maduración y postcosecha de los mismos. Su alta tasa de ablandamiento conlleva al ataque por patógenos y deterioro durante el transporte y la manipulación, resultando en grandes pérdidas económicas (La Scalia y col., 2015). De esta manera, el estudio e implementación de tratamientos capaces de retrasar la pérdida de firmeza durante la postcosecha de frutilla, resultan de gran interés para extender el tiempo de estantería de los frutos, disminuir las pérdidas postcosecha y alcanzar mercados distantes con frutos de calidad. Entre los tratamientos postcosecha más estudiados para la preservación de la calidad de frutilla se encuentran: el almacenamiento refrigerado (en un rango de temperatura, en líneas generales, de 0 a 4 °C), las atmósferas modificadas, coberturas comestibles, tratamientos físicos (térmicos y luz UV) y tratamientos químicos (Azam y col., 2019). Asimismo, los tratamientos postcosecha constituyen una herramienta útil para comprender los cambios en el metabolismo de una estructura plástica y dinámica como la pared celular en respuesta a estímulos abióticos.

2.1. Generalidades de la frutilla y su maduración

2.1.1. Características generales del fruto de frutilla

La planta de frutilla es dicotiledónea, perteneciente a la familia de las *Rosaceae*, subfamilia *Rosoideas*, y género *Fragaria* (Azam y col., 2019). Su fruto es del tipo carnososo, de los denominados frutos blandos, junto con las moras, arándanos, frambuesas y grosellas (Nunes, 2008). Estos frutos poseen características comunes tales como un tamaño pequeño, textura delicada, coloración roja a azulada intensa y una vida útil postcosecha acotada. Desde el punto de vista botánico, un fruto verdadero se define como el órgano que resulta de la transformación del tejido ovárico de una flor, que contiene en su interior a la semilla proveniente del desarrollo del óvulo. En este sentido, la frutilla se considera un fruto falso por no provenir de las paredes del ovario, siendo la parte comestible de la misma generada a partir del engrosamiento del receptáculo floral. Los frutos verdaderos son los aquenios, los cuales se encuentran ubicados en la capa epidermal del receptáculo; están ligados al mismo a través de conexiones vasculares y son considerados una combinación de tejido ovárico y semilla (Perkins-Veazie, 1995).

La frutilla constituye un modelo de estudio interesante dentro de los frutos no-climatéricos de la familia de las Rosáceas (Mezzetti, 2009). De hecho, se considera única dentro de esta familia, debido a su genoma básico pequeño (240 Mb), tiempo de generación relativamente corto, desarrollo frutal rápido (aproximadamente 30 días desde la floración hasta la obtención de los frutos maduros) y la disponibilidad de técnicas de transformación y regeneración *in vitro* (Hoffmann y col., 2006; Oosumi y col., 2006). Asimismo, el genoma de la frutilla silvestre diploide, *Fragaria vesca*, está secuenciado (Shulaev y col., 2011; Folta, 2013) y el mismo presenta una elevada identidad de secuencia con el genoma de *Fragaria x ananassa* (Bombarely y col., 2010) lo que permite la caracterización de múltiples genes de interés.

2.1.2. Principales parámetros de calidad

Los parámetros de calidad de los frutos se utilizan para evaluar al producto en relación a las especificaciones comerciales, programas de mejoramiento genético y en la evaluación de las respuestas a distintos factores ambientales y tratamientos postcosecha (Kader, 2011). La demanda comercial de los frutos no radica únicamente en el aspecto homogéneo, libre de defectos y pudriciones y de larga vida comercial, sino además en aquellos factores de calidad que el consumidor percibe a través de sus sentidos, y que conforman la calidad organoléptica del fruto. En frutilla, los principales atributos a considerar para determinar su calidad son la

firmeza, el sabor (asociado con el contenido de sólidos solubles y la acidez titulable) y la apariencia (color rojo superficial, tamaño, brillo, ausencia de daños) (Kader, 2011).

El color externo del fruto es uno de los más relevantes, debido a que esta variable es útil asimismo para determinar el grado de madurez e índice de cosecha de los mismos (Alvarado-Cepeda y col., 2020). En este sentido, los diferentes estadios de desarrollo y maduración de frutilla suelen clasificarse según el tamaño y color superficial del fruto, denominándose verde pequeño (VP), verde grande (VG), blanco (BL), 25% rojo (25%R), 50% rojo (50%R), 75% rojo (75%R), 100% rojo (100%R) y sobremaduro (SM) (**Figura 1**). Para la comercialización de la frutilla, se recomienda un mínimo de 7% de sólidos solubles y/o un máximo de 0,8% de acidez titulable, así como un porcentaje de coloración roja superficial de 75%R, como mínimo (SENASA, 2005).

Los azúcares representan el 75% de los sólidos solubles totales (Solórzano y col., 2015). Los principales azúcares presentes en el fruto maduro son glucosa (160-190 mg/g), fructosa (90-180 mg/g) y sacarosa (30-120 mg/g), seguido de myo-inositol (10-23 mg/g), y estas concentraciones varían de acuerdo al cultivar (Macías-Rodríguez y col., 2002).

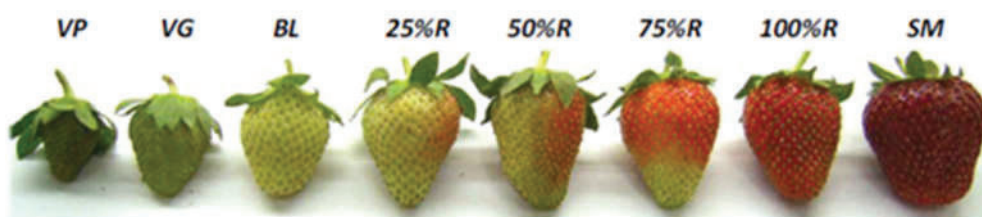


Figura 1. Clasificación de los estadios de maduración del fruto de frutilla de acuerdo al tamaño y porcentaje del color superficial. VP: Verde pequeño; VG: Verde grande; BL: Blanco; 25%R-100%R: porcentaje de color rojo superficial; SM: Sobremaduro. (Ilustración adaptada de Pombo, 2009).

2.1.3. Maduración de la frutilla

En las plantas superiores, una vez ocurrida la polinización y fecundación se produce el desarrollo de los frutos, proceso caracterizado por un crecimiento y alargamiento de los mismos. Los programas generales de maduración manifestados por la mayoría de los frutos carnosos incluyen:

- modificación del color a través de una alteración en la acumulación de clorofilas, carotenoides y/o antocianinas.
- modificación de la textura vía alteración de la turgencia celular, estructura de la pared celular y/o del metabolismo.

- importación/acumulación y modificación de azúcares, ácidos, y compuestos volátiles que afectan la calidad nutricional y el aroma.

- incremento de la susceptibilidad a patógenos (Giovannoni, 2004).

De esta manera, la maduración de los frutos carnosos puede definirse como un conjunto de procesos físicos-químicos que ocurren entre la finalización del desarrollo y el principio de la senescencia, los cuales conducen a cambios en la textura, aroma, sabor y color de los mismos. En frutos como frutilla, la división entre el desarrollo y la maduración no se encuentra claramente definida. Por lo tanto, la maduración se considera un proceso de desarrollo continuo, en el cual varias etapas fisiológicas pueden estar solapadas (Manning, 1993).

2.1.3.1. Regulación hormonal de la maduración

Desde el punto de vista hormonal y por actividad respiratoria, los frutos se clasifican fisiológicamente según la presencia (climatéricos) o ausencia (no climatéricos) de un incremento marcado en la respiración y la síntesis de la hormona gaseosa etileno al comienzo de la maduración (Paul y col., 2012). Dentro de los frutos climatéricos se destacan el tomate (*Solanum lycopersicum*), la manzana (*Malus domestica*) y la banana (*Musa acuminata*), entre otros. La frutilla, la uva (*Vitis vinifera*) y los cítricos son capaces de madurar en ausencia de un pico en la producción de etileno y de un incremento marcado en el consumo de oxígeno o producción de CO₂ proveniente de la respiración, por lo que se agrupan dentro de los denominados frutos no climatéricos. Sin embargo, en frutilla se sugirió un papel del etileno en la maduración de estos frutos (Trainotti y col., 2005; Villarreal y col., 2010; Merchante y col., 2013). Iannetta y col. (2006) observaron un incremento en los niveles de etileno al alcanzar el estadio rojo y también un aumento en el nivel de CO₂ producido. Se reportó, además, que ciertos aspectos de la maduración de frutilla como la síntesis de antocianinas, degradación de clorofilas, actividad fenilalanina amonio liasa, poligalacturonasa, β -galactosidasa y acumulación de azúcares, son acelerados o aumentados por la hormona etileno (Tian y col., 2000; Villarreal y col., 2010). Asimismo, los efectos de esta hormona en la maduración de la frutilla dependen del estadio de desarrollo del fruto (Trainotti y col., 2005; Merchante y col., 2013; Reis y col., 2020). Trainotti y col. (2005) reportaron el clonado de tres receptores de etileno en frutilla y caracterizaron los niveles de expresión de los mismos durante la maduración. Entre los resultados más relevantes, observaron que los receptores *FaEtr1* y *FaEtr2* presentan su mayor nivel de expresión en el estadio de maduración blanco. Debido a estos resultados, y si bien recientemente se sugirió que el etileno tendría también un efecto en la maduración en estadios tardíos (Gu y col., 2019; Reis y col., 2020), diversos estudios básicos

sobre el efecto de la aplicación exógena de esta hormona se llevaron a cabo en frutillas en estadio blanco (Villarreal y col., 2010; Nardi y col., 2014; Villarreal y col., 2016). Así, el estudio de la inhibición de la percepción del etileno a través de tratamientos postcosecha en frutillas maduras resulta de interés.

Las auxinas son suministradas continuamente por los aquenios en frutilla, y resultan importantes para la expansión del receptáculo en estadios tempranos del desarrollo, si bien estas hormonas también ejercen un rol inhibitorio en la maduración del mismo (Given y col., 1988). En frutilla, los niveles de auxinas son elevados al comienzo del desarrollo, y luego disminuyen gradualmente desde el estadio verde al blanco, lo que permite que la maduración progrese (Manning 1994; Estrada-Johnson y col., 2017). Se reportó que la aplicación exógena de auxinas retrasa la maduración de frutilla después de la cosecha y reprime la expresión de genes vinculados con el desensamblaje de la pared celular como poligactaruronasa1 (*FaPGI*), β -xilosidasas1 (*FaXylI*) y endo-1,4-glucanasa1 (*FaEGI*) (Villarreal y col., 2009; Bustamante y col., 2009; Castro y col., 2021), mientras que la remoción de los aquenios promueve la maduración y la expresión de genes como *expasina2* (*FaExp2*) (Nardi y col., 2016).

Las giberelinas se encuentran en cantidades menores que las auxinas si bien también colaborarían en la regulación de la maduración de frutilla (Symons y col., 2012). El ácido giberélico (GA₃) se reportó como una hormona capaz de regular negativamente la maduración de los frutos de frutilla (Martínez y col., 1994; Villarreal y col., 2009). También se sugirió un rol importante de GA₄ en el desarrollo del receptáculo, dado los niveles altos de esta hormona observados en ese tejido (Csukasi y col., 2011).

Se demostró que el ácido abscísico (ABA) actúa como molécula señal que promueve la maduración y la senescencia de frutilla acelerando la captación de sacarosa y el desarrollo del color (Chen y col., 2016). El contenido de ABA endógeno es bajo en el estadio blanco y aumenta gradualmente a medida que el fruto de frutilla se desarrolla y madura (Symons y col., 2012). El silenciamiento de un gen clave para la biosíntesis de ABA (el gen 9-cis-epoxicarotenoide) y de un gen que codifica un receptor de ABA resulta en frutos incoloros debido a la interrupción de la biosíntesis de antocianinas (Jia y col., 2011). Por otro lado, el tratamiento con ABA exógeno incrementa el contenido de antocianinas en frutilla y la expresión de genes vinculados con el desensamblaje de la pared celular (Jiang y Joyce, 2003; Bustamante y col., 2009; Nardi y col., 2016).

Los metil-jasmonatos (MJ) endógenos de frutilla modulan la maduración de los frutos, siendo su concentración mayor en frutos blancos, decreciendo con el progreso de la maduración y alcanzando su mínimo en el estadio sobremaduro (Han y col., 2019). La aplicación exógena

de MJ promueve la maduración de frutillas, incrementando significativamente la producción de etileno en dichos frutos y la expresión de genes involucrados en la pigmentación, ablandamiento y el metabolismo de azúcares (Mukkun y Singh, 2009; Han y col., 2019).

2.1.3.2. Cambios en el color

Las antocianinas son compuestos hidrosolubles de localización vacuolar que le confieren el color rojo a los frutos de frutilla, y la cuantificación del contenido de estos pigmentos suele utilizarse como un marcador del progreso de la maduración (Morales-Delgado y col., 2014). Las principales antocianinas presentes en frutilla son pelargonidin-3-O-glucósido y cianidin-3-glucósido (Karaaslan & Yaman, 2017).

Las antocianinas son sintetizadas por la vía de los fenilpropanoides y su precursor es la fenilalanina (Almeida y col., 2007). La biosíntesis de estos pigmentos involucra la participación de enzimas tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), chalcona sintasa (CHS, EC 2.3.1.74), chalcona isomerasa, flavona 3-hidroxilasa, antocianidina sintasa y flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (**Figura 2**). Las plantas producen otros metabolitos secundarios a través de esta vía, los cuales tienen importantes funciones en procesos tales como la defensa ante patógenos, la protección frente a la luz UV y ozono, entre otros (Terry y Joyce, 2004; Pombo y col., 2011a; Jin y col., 2017; Chen y col., 2019). Por lo tanto, la vía de síntesis de los fenilpropanoides es capaz de responder a diferentes estímulos del desarrollo, y a estreses del tipo biótico y abiótico (Winkel-Shirley, 2002).

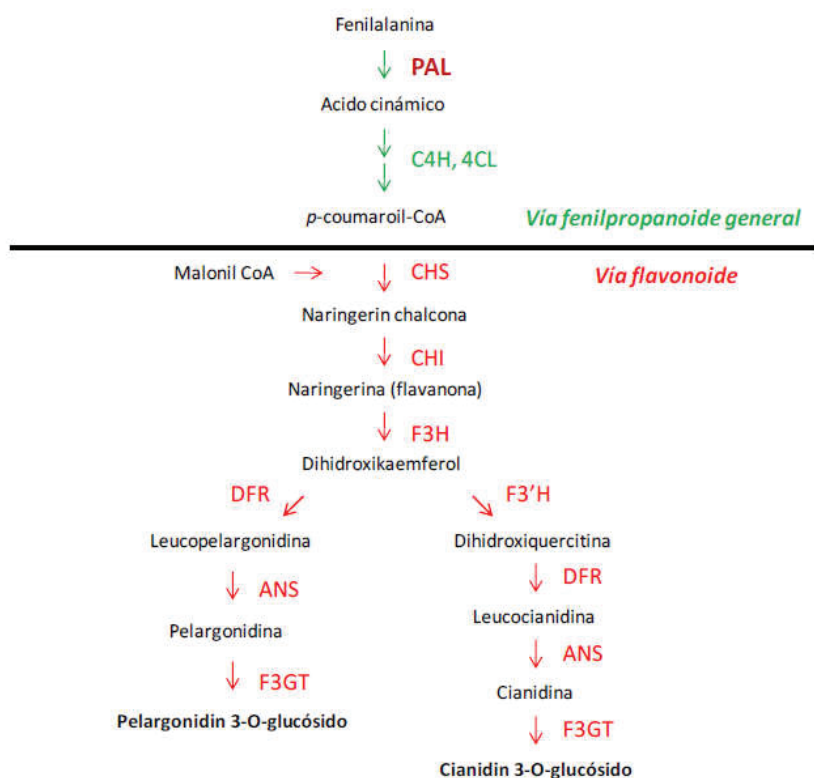


Figura 2. Esquema de la vía de los fenilpropanoides. Se destacan las principales antocianinas presentes en frutilla. PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoAligasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; DFR: dihidroflavonol 4-reductasa; F3'H: flavonoide 3 hidroxilasa; ANS: antocianidin sintasa; F3GT: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (Ilustración adaptada de Pombo, 2009).

La fenilalanina amonio liasa es la primera enzima en actuar en la vía de los fenilpropanoides, catalizando la transformación, por desaminación, de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, y es posible correlacionar la acumulación de antocianinas en frutos maduros de frutilla con una elevada actividad PAL (Pombo y col., 2011b; Ayvaz Sönmez y col., 2021). Por otro lado, como consecuencia de estreses bióticos (infecciones por virus, bacterias y hongos) y abióticos (temperaturas bajas, daños por luz UV, salinidad alta, etc.), se informó un incremento en la actividad PAL y en la acumulación de diversos compuestos fenólicos (Ayala-Zavala y col., 2004; Severo y col., 2011; Galli y col., 2016).

Los flavonoides son importantes para la adaptación de las plantas frente a condiciones adversas, entre las que se incluye la defensa ante estreses bióticos y abióticos. Actúan a través de mecanismos no específicos, si bien su efecto se debe en parte a sus propiedades antioxidantes (Treutter, 2005). Los precursores de la síntesis de la mayoría de los flavonoides son el malonil-CoA y el p-cumaril-CoA, los cuales son derivados del metabolismo de carbohidratos y de la

vía de los fenilpropanoides, respectivamente (Almeida y col., 2007). La biosíntesis de los flavonoides se inicia por el paso catalizado por la chalcona sintasa, resultando en el compuesto naringenin chalcona. En la mayoría de las plantas, las chalconas no son los productos terminales, sino que la vía prosigue con varios pasos enzimáticos alcanzando otras clases de flavonoides, tales como las flavononas, dihidro flavonoles y finalmente, las antocianinas de frutos como la frutilla (Almeida y col., 2007). Respecto al proceso de maduración, se informó que la expresión chalcona sintasa en tejidos de diversos frutos es regulada durante el desarrollo y está asociada con el color de los mismos (Aharoni y O'Connell, 2002). En este sentido, es de destacar, que el silenciamiento mediante la transformación transitoria del gen *FaCHS* en frutilla resulta en frutos sin coloración roja y en una inhibición de la producción de antocianinas y otros flavonoides en estadios tempranos de los frutos (Hoffmann y col., 2006). Asimismo, se reportó que el gen *FaCHS2*, el cual codifica una chalcona sintasa putativa de frutilla, presenta un nivel de expresión bajo en los estadios verde y blanco, y el mismo aumenta significativamente cuando los frutos se encuentran en el estadio 100% rojo (Muñoz y col., 2011).

2.1.3.3. Cambios en el sabor

La mayoría de los frutos son capaces de fotosintetizar, almacenar almidón y convertirlo en azúcares durante la maduración (Paliyath y col., 2009). En frutilla, sin embargo, se reportó que el almidón se acumula durante las etapas muy tempranas del desarrollo (7 días después de la caída de los pétalos), y que la degradación de los gránulos de almidón predomina fuertemente durante el crecimiento del receptáculo y en la maduración del mismo (Souleyre y col., 2004). Se cree que este carbohidrato se utiliza en las primeras etapas del crecimiento del fruto hasta que los achenios están desarrollados, y posteriormente, éstos inducen la rápida asimilación de nutrientes desde la planta (Perkins-Veazie, 1995). Por lo tanto, se estima que la degradación del almidón aporta únicamente hasta el 3% del contenido total de azúcares del fruto al final de la maduración (Souleyre y col., 2004).

Al igual que otros frutos, las frutillas actúan como un sumidero para la acumulación de los productos fotosintéticos generados en las hojas (Lemoine, 2000). Durante el desarrollo del fruto, una gran proporción de sacarosa se exporta desde las hojas hacia el receptáculo y una proporción menor es dirigida hacia los achenios (Manning, 1993). La sacarosa acumulada en los frutos inmaduros se hidroliza en los monosacáridos glucosa y fructosa, y estos tres carbohidratos son los constituyentes mayoritarios de los azúcares solubles en frutillas maduras (Azam y col., 2019). Asimismo, la transformación masiva de metabolitos primarios inicia el flujo de carbono hacia las vías de síntesis de metabolitos secundarios, entre ellas la acumulación

de las antocianinas (Azam y col., 2019). Por estos motivos, los frutos se cosechan en estadios tardíos de maduración (a partir de 75%R); de otra manera, el adelanto de su cosecha se traduce en una reducción del contenido de azúcares, y los atributos de la frutilla asociados al sabor y color no serían los requeridos para el consumo.

Al igual que los azúcares, los ácidos orgánicos son componentes importantes del sabor, y la relación ácido/azúcar se usa frecuentemente como un índice de la calidad del fruto (Manning, 1993). Además, determinan el pH del fruto y contribuyen a la estabilidad del color del mismo. Los ácidos principales presentes en frutilla son el cítrico, málico y ascórbico, los cuales se secuestran en vacuolas y se pueden utilizar en el proceso de respiración o en la conversión en azúcares (Perkins-Veazie, 1995).

2.1.3.4. Cambios en la textura

El nivel de firmeza de los frutos constituye un aspecto de calidad evaluado por el consumidor, a la vez que representa uno de los principales factores que determinan la vida postcosecha del producto (Kader, 2011).

Los cambios de textura que ocurren durante la maduración y postcosecha de los frutos carnosos se deben principalmente a la disolución de la lámina media, el desensamblaje de la pared celular primaria y la reducción en la turgencia celular. Las alteraciones en la estructura y composición de la pared celular primaria y lámina media están mediadas por la acción coordinada de un gran número de proteínas con y sin actividad enzimática (Vicente y col., 2007; Payasi y col., 2009; Posé y col., 2018).

En el caso de frutilla, el proceso de ablandamiento se caracteriza por una extensiva disolución de la lámina media de las células del parénquima cortical (Redgwell y col., 1997a; Santiago-Doménech y col., 2008), y a nivel de la pared celular, por una moderada solubilización y depolimerización de pectinas, y una leve reducción de polímeros hemicelulósicos (Posé y col., 2011; Moya-León y col., 2019). Sin embargo, es importante mencionar que la extensión de estos cambios varía dependiendo del cultivar estudiado (Rosli y col., 2004; Dotto y col., 2006; Bustamante y col., 2006; Villarreal y col., 2008).

2.2. Metabolismo de la pared celular primaria en frutos carnosos

2.2.1. Pared celular primaria

Las paredes celulares se clasifican en **primarias**, las cuales se forman en las células en crecimiento y se las considera relativamente no especializadas y similares en arquitectura

molecular en todos los tipos celulares, y **secundarias**, que se forman luego de que el crecimiento celular cesó y pueden ser altamente especializadas en estructura y composición (Cosgrove, 1997).

La pulpa de la mayoría de los frutos carnosos se compone por células parenquimales que poseen una pared celular primaria delgada. El modelo más aceptado indica que la pared celular vegetal primaria está conformada por una red de celulosa-hemicelulosa embebida en una matriz altamente hidrofílica de pectinas, la cual contiene otros componentes en menor proporción tales como glicoproteínas, compuestos de bajo peso molecular e iones (Posé y col., 2018) (**Figura 3**).

La pared actúa como un exoesqueleto que controla la forma celular y permite que se desarrolle una alta presión de turgencia, participa en la adhesión célula-célula, en la señalización celular, en procesos de crecimiento y diferenciación, y es una barrera contra el ataque de patógenos, siendo capaz de responder a diferentes tipos de estímulos bióticos y abióticos (Darley y col., 2001; Amil Ruiz y col., 2011; Bellincampi y col., 2014; Gall y col., 2015).

Entre células contiguas se encuentra la lámina media, rica en pectinas y constituye la interfase entre las paredes celulares de dichas células y proporciona conexiones intercelulares (Willats y col., 2001; Daher y Braybrook, 2015).

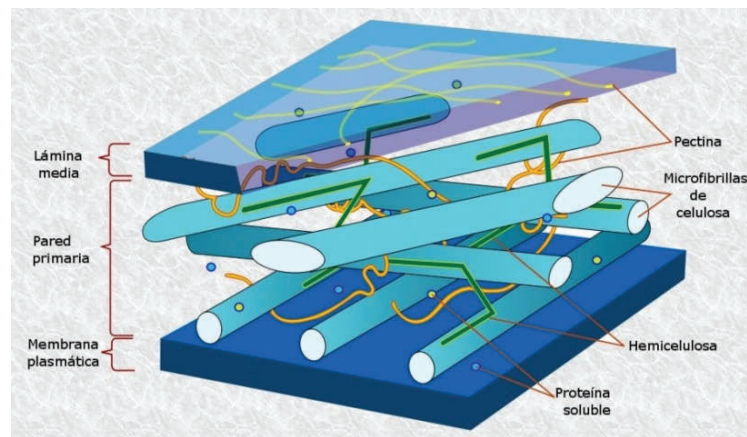


Figura 3. Modelo más aceptado de la pared celular primaria, sus componentes principales y la disposición espacial de los mismos (Ilustración adaptada de Nardi, 2014).

2.2.2. Polímeros de la pared celular primaria

En líneas generales, la pared celular vegetal primaria contiene un 35% de pectinas, 30% de celulosa, 30% de hemicelulosa y un 5% de proteínas estructurales (Payasi y col., 2009). Sin

embargo, dichos valores pueden sufrir grandes variaciones de acuerdo a la especie y tejido analizado. En frutos carnosos, el contenido de pectinas puede ser sustancialmente mayor, llegando hasta un 60% (Prasanna y col., 2007).

La celulosa está formada por más de 30 cadenas lineales ubicadas paralelamente, de 500 a 7.500 monómeros de D-glucopiranosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) (Posé y col., 2018). Las cadenas de celulosa se unen conformando microfibrillas por fuera de la membrana plasmática, como consecuencia de la interacción por puentes de hidrógeno (Posé y col., 2018). La deposición de las microfibrillas en la pared celular se caracteriza por exhibir una orientación controlada. En las paredes primarias, su orientación es generalmente perpendicular al eje de elongación celular, restringiendo el hinchamiento lateral y permitiendo la expansión longitudinal (Li y col., 2014). La celulosa posee una alta resistencia a los esfuerzos de tensión, es insoluble en agua, químicamente estable y relativamente resistente al ataque enzimático (Payasi y col., 2009).

Las hemicelulosas comprenden un grupo heterogéneo de polisacáridos que se asocian a la superficie de las microfibrillas de celulosa a través de puentes de hidrógeno, y son suficientemente largas para abarcar los 20-40 nm de distancia entre las microfibrillas de celulosa adyacentes, generando así una red de celulosa-hemicelulosa (Posé y col., 2018). Son neutras o levemente ácidas y no poseen ácido galacturónico (AG). Las clases principales de hemicelulosas halladas en la pared celular primaria son:

Xiloglucanos (XGs): es la hemicelulosa mayoritaria; es un polímero lineal de 1-4- β -D-glucosa con cadenas laterales cortas conteniendo residuos de D-xilosa, algunas de las cuales están sustituidas a su vez por D-galactosa y eventualmente una L-fucosa terminal.

Xilanos: son polímeros compuestos por una cadena principal de residuos de D-xilosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4), que pueden estar sustituidos con residuos de ácido α -D-glucurónico y de α -L-arabinosa (o su derivado metilado) y grupos acetilos.

Glucomananos: son moléculas con regiones alternantes de β -1,4-glucanos y β -1,4-mananos, con ocasionales residuos de α -D-galactosa como cadenas laterales (Broxterman, 2018).

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos altamente hidrofílicos que contienen característicamente azúcares ácidos tales como el AG y el glucurónico. Las pectinas más abundantes de la pared celular vegetal son los homogalacturonanos (HGs), polímeros lineales formados por 100-200 residuos de AG unidos por enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 4) (Posé y col., 2018). Los ramnogalacturonanos de tipo I (RG I) son pectinas formadas por un disacárido de ramnosa y AG que se repite numerosas veces, y cadenas laterales. Las

cadena laterales contienen principalmente arabinanos, galactanos, arabinogalactanos, aunque también pueden presentar otros azúcares neutros, tales como L-fucosa, D-glucosa, D-manosa y D-xylosa. El número de residuos laterales varía desde un único residuo a 50 o más. Otras pectinas menos abundantes y altamente complejas son los ramnogalacturonanos de tipo II (RG II), los cuales contienen residuos de al menos diez azúcares diferentes y cadenas laterales integradas por varios tipos de residuos de azúcares neutros (Posé y col., 2018). También se encuentran los xilogalacturonanos que son cadenas de HGs en la que parte de las unidades de AG están sustituidas por residuos de D-xilosa y/o pequeñas cadenas de xilosa, unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 3) (Broxterman, 2018). En la pared celular primaria, las pectinas actúan como una matriz altamente hidratada que determina la porosidad, modula el pH y el balance iónico y son una fuente de moléculas de señalización involucradas en varias respuestas biológicas tales como el ablandamiento y defensa de los frutos (Willats y col., 2001; Posé y col., 2018).

Las proteínas estructurales se clasifican de acuerdo a su composición predominante de aminoácidos en glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina, entre otras (Albenne y col., 2014). Las más estudiadas son las proteínas que forman redes covalentes como, por ejemplo, las proteínas ricas en prolina (PRP), extensinas (EXT) y proteínas de arabino-galactano (AGP) (Albenne y col., 2014). Recientemente, se reportó que los AGP tendrían un rol en la maduración de frutos (Leszczuk y col., 2020).

Habitualmente, para analizar las modificaciones de la pared celular relacionadas a la maduración de los frutos carnosos, se aíslan las paredes celulares y se realiza una extracción secuencial para la obtención de fracciones enriquecidas en los diferentes componentes (Brummell, 2006). Las paredes celulares se aíslan sometiendo al fruto a una ebullición en etanol absoluto, para luego filtrar. Dado que los polímeros son insolubles en alcohol, el sólido retenido está compuesto fundamentalmente por las paredes celulares. Las paredes celulares aisladas son el material de partida para las extracciones de cada grupo de polímeros, las cuales se llevan a cabo utilizando: agua, para separar las pectinas unidas por interacciones débiles (pectinas solubles en agua o PSA); agentes quelantes, usualmente EDTA, para secuestrar los iones y extraer las pectinas unidas por interacciones iónicas (pectinas solubles en EDTA o PSE); HCl en caliente para hidrolizar los enlaces covalentes y solubilizar las pectinas unidas covalentemente (pectinas solubles en HCl o PSH); solución alcalina fuerte, por ejemplo NaOH 4 M, que permite la solubilización de hemicelulosas débil y fuertemente unidas a la pared celular. El residuo remanente se compone principalmente por celulosa (Brummell, 2006).

2.2.3. Principales enzimas involucradas en el metabolismo de la pared celular

El ablandamiento asociado a la maduración de frutos carnosos es principalmente consecuencia del efecto acumulativo de modificaciones en la pared celular, las cuales ocurren a través de un sistema sensible, altamente sincronizado de señales y enzimas que actúan sobre los distintos componentes de esta estructura y conducen al desensamblaje de la pared celular y lámina media (Brummell y Harpster 2001; Vicente y col., 2007; Posé y col., 2018). Cada enzima involucrada en el metabolismo de la pared celular exhibe una actividad particular (hidrolasa, transglicosilasa, liasa, etc.) y requiere reconocer su propio sustrato en el apoplasto. Después de la acción del primer conjunto de enzimas, habitualmente quedan expuestos polímeros ocultos que serán los sustratos de un segundo conjunto de enzimas (Moya-León y col., 2019).

Entre las enzimas que catalizan la solubilización y/o despolimerización parcial o completa de los polisacáridos de la pared celular, se encuentran:

A) Enzimas que participan en el metabolismo de las hemicelulosas

Endo- β -1,4-D-xilanasas (Xnasas, EC 3.2.1.8): las endoxilanasas catalizan la hidrólisis de las uniones β -1,4 entre residuos de D-xilosa en sitios internos de las cadenas de xilanos, produciendo xilooligosacáridos, los cuales son los sustratos de las β -D-xilosidasas (Peng y Jin, 2020). Se sugirió un rol de la actividad Xnasa en la interrupción de la red celulosa-hemicelulosa y en el proceso de ablandamiento en papaya (Manenoi y Paull, 2007) y arándanos (Chea y col., 2019), ambos frutos climatéricos. Recientemente, se reportó el patrón de actividad Xnasa total durante la maduración de frutos de dos cultivares de frutillas con tasas de ablandamiento contrastantes (Hirsch y col., 2021). En el cultivar de ablandamiento acelerado (Toyonoka) la actividad Xnasa total aumentó entre el estadio verde grande y blanco manteniéndose constante hasta el final de la maduración. Asimismo, se observó que la actividad Xnasa fue significativamente mayor en los estadios 50 y 100%R en el cultivar de frutos más blandos respecto al cultivar que rinde frutos firmes (Camarosa) (Hirsch y col., 2021).

β -xilosidasas (β -Xils, EC 3.2.1.37): las xilosidasas liberan residuos de xilosa a partir del extremo no reductor de los xilooligosacáridos producidos por las endoxilanasas (Rohman y col., 2019). Varios estudios sugieren su rol en la degradación de xilooligosacáridos. La actividad β -xil se midió en distintos frutos carnosos como tomate (Itai y col., 2003), palta (Ronen y col., 1991), aceituna (Fernandez-Bolanos y col., 1995) y papaya (Thumdee y col., 2010). En frutilla,

se detectó actividad β -xil total en todos los estadios de maduración, siendo significativamente menor en los estadios inmaduros y alcanzando un máximo en 25-50%R (Martínez y col., 2004). Asimismo, frutos del cultivar Toyonoka exhibieron una actividad β -Xil total mayor que frutos del cultivar Camarosa (Bustamante y col., 2006). Si bien el contenido de xilosa fue superior en la fracción hemicelulósica, debido a la presencia de xilosa en los xilogalacturonanos, los autores no descartaron un posible efecto de la acción β -Xil sobre las pectinas (Bustamante y col., 2006).

Expansinas (Exps): son proteínas cuya función sería la de interrumpir los puentes de hidrógeno que unen las microfibrillas de celulosa y hemicelulosas de una manera dependiente del pH, permitiendo la relajación de la pared celular (Posé y col., 2018). Se cree que no poseen actividad transglicosilasa o hidrolasa, y su actividad puede ser puesta de manifiesto sólo por su efecto sobre las propiedades biomecánicas de tejidos vegetales (Vicente y col., 2007). La expresión de genes de expansinas se asoció con el desarrollo y maduración de frutilla (Civello y col., 1999; Dotto y col., 2006) y dado sus efectos directos sobre la pared celular, se hipotetizó que la acción de las expansinas facilitaría el acceso de otras enzimas a sus sustratos, contribuyendo de este modo al desmantelamiento de la pared celular en el proceso de ablandamiento (Brummell y Harpster, 2001). En frutilla, se aislaron siete genes de expansinas (*FaExp1-FaExp7*) y las expresiones de *FaExp1*, *FaExp2* y *FaExp5* se correlacionaron con el proceso de maduración del fruto (Civello y col., 1999; Harrison y col., 2001; Dotto y col., 2006).

Xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTHs): estas enzimas tendrían diferentes actividades catalíticas de acuerdo a sus efectos sobre la pared celular. La actividad xiloglucano endohidrolasa (XEH; EC 3.2.151) permite la ruptura hidrolítica de la cadena de xiloglucano. Mientras que la actividad xiloglucano transglicosilasa (XET, EC 2.4.1.207) cataliza una ruptura no hidrolítica y posteriormente, transfiere y liga el extremo de la cadena escindida al extremo no reductor de otra cadena de xiloglucano preexistente o recién sintetizada (Eklöf y Brumer, 2010). Esta última característica de la actividad XET es fundamental en la expansión de la pared celular, ya que conduce a la relajación de la misma sin provocar la desestabilización completa (Iglesias Méndez, 2008). Primeramente, las XTHs se vincularon al desensamblaje de la matriz celulosa-xiloglucano, contribuyendo al ablandamiento de los frutos. Diferentes autores sugirieron un rol de las XTHs en el proceso de ablandamiento de kiwi, manzana, chirimoyo y banana (Atkinson y col., 2009; Li y col., 2009; Mbéguié-A-Mbéguié y col., 2009). Sin embargo, estudios más recientes propusieron que la actividad XET estaría involucrada en el

mantenimiento de la integridad de la pared celular más que en su desmantelamiento (Miedes y Lorences, 2009; Miedes y col., 2010). Los autores propusieron que una disminución de la actividad XET detectada durante la maduración de tomate contribuiría al ablandamiento del fruto. Más aun, en frutilla se clonaron dos genes que codifican una proteína putativa que poseería ambas actividades (XEH y XET; *FaXTH2*) y un gen que codifica una proteína putativa con que tendría actividad XET exclusiva (*FaXTH1*) (Nardi y col., 2014). En este último trabajo, se detectó que la expresión *FaXTH1* es significativamente mayor en dos cultivares de firmeza elevada, respecto a un cultivar de frutos blandos Toyonoka.

B) Enzimas que participan en el metabolismo de pectinas

Poligalacturonasas (PGs): catalizan la hidrólisis de uniones α -1 \rightarrow 4, que mantienen unidos residuos de AG y pueden ser del tipo endo- (EC 3.2.1.15) o exo-poligalacturonasas (EC 3.2.1.67) (Posé y col., 2011). Si bien ambos tipos de enzimas se encuentran en frutos, sólo las enzimas de tipo endo- fueron reportadas como específicas de la maduración (Hadfield y Bennett, 1998). Las PGs actúan fundamentalmente sobre los HGs, los cuales se sintetizan y secretan al espacio apoplástico con un alto grado de metil esterificación (Willats y col., 2001). Dado a que los HGs deben ser demetilados antes de convertirse en sustrato para las poligalacturonasas (Willats y col., 2001; Paniagua y col., 2014; Posé y col., 2018), la actividad PG *in vivo* estaría influenciada por una acción previa de las pectin metilesterasas. Se reportó que en frutilla, la actividad PG total se incrementó durante la maduración del fruto y que la misma fue significativamente mayor en todos los estadios de maduración de frutillas pertenecientes al cultivar Toyonoka respecto a frutos de dos cultivares más firmes (Villarreal y col., 2008). Asimismo, la reducción en la expresión del gen *FaPG1* a través de la tecnología antisentido, dio lugar a frutillas significativamente más firmes que los frutos de plantas salvajes (Quesada y col., 2009). La mayor firmeza de los frutos transgénicos se asoció con una reducción de la solubilización de pectinas y un aumento del contenido de pectinas unidas por interacciones covalentes (Quesada y col., 2009). Se reportó, además, que la expresión del gen y la acumulación de la proteína FaPG1 aumentó durante la maduración de frutilla y fue mayor en cultivares de firmeza baja respecto a cultivares de firmeza elevada (Villarreal y col., 2008; Villarreal y col., 2009). Más recientemente, se reportó que el silenciamiento de *FaPG1* dio lugar a modificaciones significativas en la nanoestructura de las pectinas, lo cual se correlacionó con la reducción del ablandamiento de los frutos (Posé y col., 2015).

Pectato liasas (PLs, EC 4.2.2.2): intervienen en la degradación de pectinas en los mismos sitios que las PGs pero la ruptura de la cadena de HG no ocurre a través de un proceso hidrolítico, sino que la catálisis se produce por una reacción de β -eliminación, la cual introduce una insaturación C4-C5 en el extremo no reductor del producto de reacción (Zhou y col., 2016). En frutilla se halló que la actividad PL presentó bajos niveles en los estadios VP y BL, y se mantuvo a niveles altos en los estadios subsecuentes (Zhou y col., 2016). Se identificaron tres genes PL (*FaPLA*, *FaPLB* y *FaPLC*) que se expresan en frutos de frutilla (Medina-Escobar y col., 1997, Benítez-Burraco y col., 2003). El gen *FaPLC* se caracterizó funcionalmente mediante el uso de plantas de frutilla transgénicas antisentido, y se observó que los frutos provenientes de estas plantas exhibieron un retraso significativo de la pérdida de firmeza comparado con las plantas del tipo salvaje (Jiménez-Bermúdez y col., 2002). Asimismo, los frutos transgénicos presentaron una disminución de la solubilización de pectinas así como una menor despolimerización de las PSE y PSH (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Santiago-Doménech y col., 2008).

Pectin metilesterasas (PMEs, EC 3.1.1.11): las pectin metilesterasas catalizan la hidrólisis de metil ésteres del C-6 de residuos de AG liberando metanol (Posé y col., 2011). La demetilación cambia el pH y la carga en la pared celular lo que permite la interacción de poliurónidos a través de puentes de calcio. Pero, por otro lado, la demetilación torna más susceptibles a los polímeros pécticos a la degradación por PGs o PLs. De este modo, las PMEs poseen una acción dual interviniendo tanto en el refuerzo como en el debilitamiento de la pared celular (Posé y col., 2011).

Respecto al modo de acción de las PMEs, se hipotetizó que algunas isoformas actuarían de forma localizada, demetilando zonas específicas y delimitadas, aunque se describió la presencia de pectinas con demetilación aleatoria (Willats y col., 2001). En frutilla, se observó una actividad PME máxima en frutos verdes que decreció gradualmente hasta alcanzar un mínimo en el estadio sobremaduro (Draye y Van Cutsem, 2008). Castillejo y col., (2004) reportaron la existencia de cuatro genes que codifican PMEs putativas (*FaPME1-FaPME4*). Los autores informaron que la expresión del gen *FaPME1* fue específica de fruto, y el patrón de expresión del mismo reveló dos picos durante la maduración, aumentando considerablemente desde el estadio verde al blanco, y luego desde el estadio 25%R al 50%R, detectándose aún expresión en frutos maduros, lo cual coincidió con la actividad PME total durante la maduración de frutilla. Notablemente, informaron que la expresión de *FaPME1* fue inducida por auxinas y reprimida por el etileno, lo cual contrasta con el efecto de estas dos

hormonas en *FaPGI* (Villarreal y col., 2008; Villarreal y col., 2016). Es de destacar que, los frutos de plantas transgénicas de *Fragaria vesca* que sobreexpresaron el gen *FaPME1*, presentaron pectinas con un grado de metil esterificación significativamente menor que las plantas salvajes, así como una menor depolimerización de las pectinas unidas por interacciones iónicas (PSE) (Osorio y col., 2008). Asimismo, los frutos transgénicos aumentaron su resistencia a *Botrytis cinerea*, y presentaron una expresión constitutiva de un gen vinculado a la síntesis de ácido salicílico. Se sugirió que la activación de la respuesta de defensa ante patógenos podría relacionarse con una menor metil esterificación de los oligogalacturónidos (OGAs), ya que los OGAs generados son capaces de elicitar diferentes respuestas celulares, entre ellas respuestas de defensa ante estreses bióticos (Osorio y col., 2008; Ferrari y col., 2013).

Dado el rol central de las PME's en el metabolismo de pectinas de frutilla, diversos grupos de investigación trataron a los frutos con soluciones de PME's exógenas (ya sea de fuentes fúngicas o vegetales) (Degraeve y col., 2003; Duvetter y col., 2005; Fraeye y col., 2009; Galetto y col., 2010). Existen diversos métodos para la infusión de PME's exógenas en frutillas entre los que se puede citar ósmosis pasiva (con o sin gradiente de temperatura), infusión asistida por vacío o infusión asistida por alta presión (Duvetter y col., 2005; Fraeye y col., 2009; Galetto y col., 2010). Sin embargo, es de destacar que los tratamientos con PME's exógenas implican una serie de factores que influyen significativamente en la efectividad y aplicabilidad de los mismos. Entre ellos cabe mencionar: 1) los métodos utilizados para lograr la penetración de la enzima (los cuales pueden ser lentos o bien ocasionar daños en el fruto); 2) la accesibilidad de la enzima al sustrato y la actividad de la misma en el apoplasto del fruto tratado; 3) el costo de las enzimas comerciales.

Por estos motivos, el desarrollo e implementación de tratamientos que permitan aumentar la actividad de las PME's endógenas de los frutos podría constituir una estrategia económica y sencilla para mantener la calidad postcosecha tanto de frutillas frescas como congeladas.

C) Enzimas que participan en el metabolismo de cadenas laterales

β -Galactosidasas (β -Gals, EC 3.2.1.23): exo-hidrolasas que remueven residuos de β -D-galactosa a partir del extremo no reductor de β -D-galactósidos que pueden hallarse en hemicelulosas y, más abundantemente, en pectinas (Trainotti y col., 2001; Payasi y col., 2009). Se sugirió que, durante la maduración de los frutos, la actividad de β -Gal produce un incremento en la solubilización de las pectinas, lo que conduce a un mayor ablandamiento de los frutos.

Dicho efecto sería producido de forma directa, aumentando la solubilidad de los RG I, e indirectamente mediante el incremento de la porosidad de la pared celular, facilitando el acceso de PME y PG a sus sustratos (Brummell y Harpster, 2001). En frutilla, la actividad β -Gal total se detectó en el estadio VG, a partir del cual se incrementó significativamente (Trainotti y col., 2001). En frutilla, se aislaron cuatro cDNAs de genes que codifican β -galactosidasas putativas y, mientras *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3* se expresaron principalmente en frutos verdes, *Fa β Gal1* y *Fa β Gal4* mostraron un patrón de expresión relacionado a la maduración del fruto (Trainotti y col., 2001; Paniagua y col., 2016). Recientemente se generaron plantas transgénicas que expresaron el gen *Fa β Gal4* antisentido de manera constitutiva (Paniagua y col., 2016). Se informó que frutos transgénicos fueron un 30% más firmes, y que presentaron un incremento del contenido de pectinas unidas covalentemente y un mayor contenido de galactosa que frutos controles en el estadio maduro (Paniagua y col., 2016).

α -Arabinofuranosidasas (α -AraS, EC 3.2.1.55): las arabinofuranosidasas son exo-hidrolasas que remueven residuos terminales α -L-arabinosa no reductores de varios homopolisacáridos (arabinanos) y heteropolisacáridos (arabinogalactanos, arabinoxilanos, arabinoxiloglucanos, glucuronoarabinoxilanos, etc.) de polímeros pécticos y hemicelulósicos (Tateishi, 2008). En frutilla, se detectó actividad α -Ara total en todos los estadios excepto en VP, y la actividad se incrementó con el avance de la maduración del fruto. Asimismo, los niveles de esta actividad fueron mayores en el cultivar más blando respecto al cultivar de frutos más firmes (Rosli y col., 2009).

2.2.4. Cambios en la composición de la pared celular de frutos carnosos durante la maduración

En líneas generales, las modificaciones responsables del ablandamiento de los frutos carnosos involucran la pérdida de cadenas laterales, la despolimerización y solubilización de pectinas y la degradación de hemicelulosas. Más específicamente, los cambios se deben a la remoción de azúcares de las cadenas laterales, eliminación de metil-esteres y la ruptura de los HGs, así como a la despolimerización de hemicelulosas (Brummell, 2006; Paniagua y col., 2014).

Los polímeros pécticos pueden sufrir despolimerización con una consecuente reducción de su masa molecular (Brummell, 2006), y la despolimerización de pectinas suele ocurrir en estadios tardíos de la maduración (Mercado y col., 2011).

En frutos carnosos, los HGs sufren una demetilación progresiva durante el proceso de maduración (Prasanna y col., 2007). Las pectinas son sintetizadas en el aparato de Golgi y secretadas al apoplasto con un alto grado de metil esterificación (70-80%) (Willats y col., 2001). Una vez incorporados a la matriz, los HGs pueden ser enzimáticamente demetilados en el C-6 por la acción de las PME. Los HGs demetilados adquieren una densidad de carga negativa y los residuos de AG de HGs adyacentes pueden interaccionar a través de puentes de iónicos de calcio estabilizando la pared celular y lámina media, otorgando rigidez y permitiendo una mayor cohesión entre células (Willats y col., 2001; Jarvis y col., 2003). Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, los HGs demetilados constituyen el sustrato de las enzimas pectinolíticas (PGs y PLs), las cuales generan un acortamiento y solubilización irreversible de dichas moléculas conduciendo al desensamblaje de la pared celular y a la disrupción célula-célula (Daher y Braybrook, 2015). De esta manera, la actividad PME constituye un punto de control clave tanto en el ensamblaje como en el desensamblaje de la red de pectinas (Willats y col., 2001).

Por otra parte, durante la maduración de la mayoría de los frutos carnosos, se produce la pérdida de azúcares neutros, principalmente de galactosa y arabinosa (Redgwell y col., 1997b). La arabinosa es el azúcar neutro principal de frutilla, y su contenido disminuye durante la maduración (Koh y Melton, 2002) correspondiéndose con el aumento de la actividad α -arabinofuranosidasa (Rosli y col., 2009). Si bien inicialmente se reportó que la galactosa se encuentra en menor proporción que la arabinosa y que su pérdida sería menos importante en frutilla comparado con otros frutos (Redgwell y col., 1997b; Koh y Melton, 2002), estudios más recientes demostraron que frutillas transgénicas con una actividad β -gal reducida, fueron más firmes que frutos controles (Paniagua y col., 2016).

Se postuló también que, la remoción de arabinosa y galactosa de las cadenas laterales de pectinas en la pared celular podría resultar en un incremento de la porosidad de la misma, facilitando el acceso de otras enzimas a sus sustratos y conduciendo al ablandamiento, o bien podría tener un efecto directo en las propiedades mecánicas de la pared (Koh y Melton, 2002; Brummell, 2006; Paniagua y col., 2016).

En un estudio comparativo entre cultivares de frutilla con firmezas contrastantes, se observó que el contenido de pared celular total y el de pectinas totales disminuye continuamente durante la maduración, mientras que no se observaron cambios en el contenido de azúcares neutros (Rosli y col., 2004). En líneas generales se reportó que el contenido de PSA se incrementó en los estadios de maduración evaluados. Por otro lado, el contenido de PSH disminuyó durante la maduración de los frutos de los tres cultivares y no se observaron

diferencias significativas en el contenido de PSE entre los distintos estadios, ni entre cultivares (Rosli y col., 2004). Asimismo, los autores reportaron que el cultivar de menor firmeza fue el único en presentar PSA y PSH despolimerizadas. Finalmente, los autores informaron que la cantidad de hemicelulosas y celulosas disminuyó durante la maduración de todos los cultivares estudiados.

2.2.4.1. Hidratación *in vitro* de paredes celulares

La solubilización de pectinas está vinculada con el incremento de la pérdida de uniones pectinas-pared celular, lo cual permite extraer un mayor contenido de pectinas débilmente unidas a la pared celular, principalmente aquellas que son extraídas con agua (Paniagua y col., 2014). Con el fin de estudiar la solubilización de pectinas durante el ablandamiento, Redgwell y col., (1997a) aislaron paredes celulares de varios tipos de frutas en estadio inmaduro y maduro y las resuspendieron en agua. Luego de la decantación de las paredes celulares, midieron la altura del sólido hidratado. Observaron que las muestras provenientes de frutos de textura blanda (tales como kiwi, frutilla, tomate y zarzamoras) exhibieron un incremento considerable de la hidratación de las paredes celulares en el estadio maduro respecto al temprano. No obstante, no observaron diferencias en la hidratación de paredes celulares de frutos que maduraron hasta quedar crujientes (manzanas, pera y sandía). Asimismo, los autores informaron una mayor solubilización de pectinas y pérdida de arabinosa y galactosa de muestras de los frutos de textura blanda en estadio maduro (Redgwell y col., 1997b). De esta manera, la hidratación de la pared celular asociada con la maduración de frutos de textura blanda estaría vinculada con la mayor solubilización de pectinas, la hidrólisis de cadenas laterales y la pérdida de la red celulosa-hemicelulosa.

Cuando se analizó la hidratación *in vitro* de paredes celulares de kiwi extraídas 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días después de un tratamiento con etileno, se reportó un incremento marcado de la hidratación a medida que el fruto maduraba (Redgwell y col., 1997a). Sin embargo, a los 10 días, los autores observaron una disminución marcada de la hidratación del sólido decantado, asemejándose a aquella observada entre los días 2 y 4 después del tratamiento. Los autores propusieron que en los estadios sobremaduros la disrupción de la pared es tal que facilitaría la movilidad de enzimas tales como xiloglucanasas o xiloglucanos endo-transglicosilasas/hidrolasas que modifican los polímeros hemicelulósicos, causando el colapso de la estructura microfibrilar y reduciendo de esta manera la hidratación *in vitro* de la pared celular (Redgwell y col., 1997b).

2.3. Respuestas de defensa en frutilla

Junto con los cambios que ocurren durante la maduración de frutilla (sección 2.1.3), el aumento de la susceptibilidad a la infección por patógenos es uno de los más notables (Amil Ruiz y col., 2011). Uno de los motivos es el desensamblaje de la pared celular que actúa como una barrera preformada ante microorganismos invasores durante la maduración del fruto (Guidarelli y col., 2011). También algunos metabolitos secundarios que cumplen funciones importantes en la determinación sensorial y nutricional de los frutos, pueden actuar como moléculas de defensa preformadas contra varios patógenos (Amil Ruiz y col., 2011). La vía de los fenilpropanoides (sección 2.1.3.2.) conduce a la síntesis de la mayoría de estos metabolitos de defensa (Singh y col., 2010).

Botrytis cinerea es el patógeno principal durante la pre y postcosecha de frutilla y el causante de la pudrición gris de los frutos (Feliziani y Romanazzi, 2016). La infección por *B. cinerea* puede ocurrir antes de la fructificación pero suele permanecer reprimida hasta la maduración del fruto (Feliziani y Romanazzi, 2016). Se cree que el aumento de la susceptibilidad es debido a la disminución de la integridad de la pared celular y del contenido de compuestos antifúngicos que aportan la resistencia a la infección en frutos rojos (Amil Ruiz y col., 2011). En este sentido, frutillas en estadio blanco inoculadas con *B. cinerea*, fueron menos susceptibles a la infección respecto a frutos rojos, y en ambos casos el avance de la enfermedad se vio acompañada de una disminución de la firmeza de los frutos (Nagpala y col., 2016). Asimismo, se observaron concentraciones elevadas de pro antocianinas, elagitininas y catequinas en frutos inoculados (Puhl y Treutter, 2008; Nagpala y col., 2016).

Una vez que se traspasan las barreras primarias de defensa, los elicitores de los patógenos inducen una cascada de respuestas de defensa en la célula vegetal que incluyen el endurecimiento de la pared celular con mayor deposición de calosa, lignina y suberina, aceleración de la muerte celular (reacción de hipersensibilidad), producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), fitoalexinas, compuestos fenólicos, entre otros (Nishad y col., 2020). Un rol destacado en la respuesta de defensa de las plantas ante los patógenos se asigna a un grupo importante de proteínas vegetales cuyos genes y actividades son regulados en condiciones de estrés biótico y abiótico (Amil Ruiz y col., 2011). Pombo y col. (2011a, 2011b), relacionaron el incremento de actividades enzimáticas y expresión de un conjunto de genes de frutilla con el incremento de la resistencia del fruto a *B. cinerea*. Los autores estudiaron el efecto del tratamiento con luz UV-C sobre el crecimiento de *B. cinerea* durante la postcosecha de frutilla y analizaron la actividad de enzimas tales como fenilalanina amonio liasa, polifenol oxidasas, peroxidasas y β -1,3-glucanasa, así como el nivel de expresión de los genes *FaPAL6*,

FaChi2-2, *FaChi3*, *FaBG2-1*, *FaBG2-3* y *FaPR*. En frutos tratados con UV-C, se observó un aumento de la resistencia al desarrollo del patógeno y, en general, tanto la expresión como las actividades enzimáticas analizadas se incrementaron como efecto del tratamiento (Pombo y col., 2011a; 2011b).

A continuación, se describen aquellas enzimas clásicamente estudiadas dado su rol en respuestas de defensa de los frutos:

Peroxidasas (PODs, EC: 1.11.1.7)

Las peroxidasas pueden ser citosólicas o apoplásticas, y están vinculadas con un amplio rango de funciones. Por un lado, son conocidas por proporcionar protección contra la oxidación biológica, pero también pueden actuar promoviendo la formación de especies altamente reactivas como radicales libres y por proteger a la planta del ataque de patógenos. Cuando la actividad POD se incrementa en respuesta a la inducción por un elicitador o por un patógeno, ocurre una rápida síntesis de EROs que promueve la muerte celular e inhibe las actividades patogénicas en el sitio de infección, así como metabolitos antimicrobianos (fitoalexinas) (Almagro y col., 2009; Prasannath, 2017). Por otro lado, las PODs participan en la biosíntesis de lignina y suberina, sustancias que luego se depositan en la pared celular vegetal. Estos procesos se llevan a cabo durante el crecimiento, como parte normal del desarrollo de la pared celular, o en respuesta a varios factores externos como daño mecánico y ataque de patógenos, reforzando la pared celular y obstaculizando el crecimiento y desarrollo de los mismos (Almagro y col., 2009; Yeh y col., 2014). En frutilla, la actividad POD se incrementa gradualmente durante el desarrollo alcanzando su máximo en el estadio blanco y posteriormente, disminuye, observándose la menor actividad en los estadios maduros (Civello y col., 1995; López y col., 2010). Asimismo, se reportó la regulación positiva de un gen que codifica una peroxidasa en respuesta a la infección con *Colletotrichum acutatum* (Guidarelli y col., 2011), y que tanto el tratamiento con luz UV-C como con MJ fue capaz de incrementar la actividad POD (Pombo y col., 2011a; Asghari y Hasanlooe, 2016).

Polifenol oxidasas (PPOs, EC: 1.10.3.1)

Las polifenoloxidasas son enzimas dependientes de Cu que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a O-quinonas (Taranto y col., 2017). Las O-quinonas formadas son muy inestables y forman rápidamente polímeros marrones que causan una coloración pardusca (pardeamiento) no deseada en muchos frutos y vegetales durante su postcosecha (Taranto y col., 2017). Por otro lado, se reportó que plantas de tomate que sobreexpresan una PPO de papa,

presentaron un aumento en la resistencia a enfermedades (Li y Steffens, 2002). En concordancia, plantas de tomate transgénicas en un gen PPO antisentido, mostraron una disminución de la actividad PPO así como un incremento de la susceptibilidad ante patógenos (Tantasawat y col., 2004). Se sugirió que el rol de las PPOs en respuestas de defensa ante estímulos bióticos y abióticos podría estar directamente relacionada a la toxicidad de las quinonas, el entrecruzamiento de quinonas con proteínas o compuestos fenólicos, formando barreras físicas, y la producción de especies reactivas de oxígeno (Taranto y col., 2017). En frutilla, la actividad PPO llega al máximo en el estadio verde grande, y luego disminuye continuamente a lo largo de la maduración (Jia y col., 2016). La sobreexpresión de *FaPPO1* retrasó la infección fúngica y generó cambios en la expresión de otros genes relacionados con la patogénesis (genes codificantes para POD, fenilalanina amonio liasas y quitinasas) (Jia y col., 2016). Asimismo, la expresión del gen *FaPPO1* se indujo por estímulos bióticos (*B. cinerea*) y abióticos (temperatura baja, NaCl y H₂O₂, tratamiento con MJ) (Jia y col., 2016). Asimismo, el tratamiento con luz UV-C, aumentó la actividad PPO de frutillas cosechadas en el estadio 75%R luego de 10 y 48 hs de almacenamiento a 20 °C (Pombo y col., 2011a).

Fenilalanina amonio liasas

Previamente (sección 2.1.3.2.) se describió la acción catalítica de las PALs y su importancia en la vía de los fenilpropanoides. Estos compuestos cumplen funciones importantes para las plantas como la defensa contra patógenos y predadores, la atracción de polinizadores y dispersión de semillas, la formación de paredes celulares secundarias, la protección contra la irradiación UV, la comunicación con otros organismos, entre otras (Vogt, 2010). Una variedad de compuestos fenólicos simples, que incluye a antocianinas, estilbenos, flavonoides, isoflavonas, precursores de ligninas, y otros compuestos, son fundamentales en muchas especies para combatir a los patógenos tanto de forma directa, inhibiendo su crecimiento, germinación e invasión, como también a través de la formación de barreras estructurales que limitan su penetración (Dixon y Paiva, 1995). En el fruto de melón se aisló y caracterizó un gen PAL cuya expresión es regulada tanto en respuesta al desarrollo del fruto como por señales de herida (Diallinas y Kanellis, 1994). En manzana la actividad PAL, POD y PPO se incrementaron al enfrentar los frutos con un agente de biocontrol que inhibió el crecimiento de un hongo causante de la pudrición azul (Zhang y col., 2017). Las respuestas de defensa relacionadas al incremento de actividad enzimática y expresión de genes PAL también son inducidas por estímulos abióticos. Recientemente, se reportó que la exposición de palta a luz LED roja redujo significativamente la pudrición por antracnosis, a través de la regulación

positiva de genes PAL (Mpai y Sivakumar, 2020). En frutilla se reportaron cinco secuencias parciales para PALs putativas (*FaPAL1 – FaPAL5*), y el clon completo para *FaPAL6* (Pombo y col., 2011b). Se reportó que tanto la expresión de *FaPAL1* como *FaPAL6* son específicas de fruto y su mayor expresión se detecta en los estadios de maduración 75 y 100%R, y es mayor en cultivares que con mayor contenido de antocianinas (Pombo, 2009; Pombo y col., 2011b). Interesantemente, el tratamiento postcosecha con luz UV-C incrementó significativamente la actividad y expresión PAL asociada en frutillas del cultivar Toyonoka cosechadas en estadio de madurez comercial luego de 4 y 24 hs de almacenamiento postcosecha (Pombo y col., 2011a).

Proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs)

El término incluye a todas las proteínas inducidas por microorganismos, aunque algunas de ellas generalmente están presentes constitutivamente en la planta, y únicamente aumentan después de la detección de estreses bióticos y/o abióticos. Las proteínas PR pueden presentarse de manera intracelular o en los espacios intercelulares, particularmente en las paredes celulares de diferentes tejidos (Ali y col., 2018). Las proteínas PR se descubrieron inicialmente como proteínas que son fuertemente inducidas en la planta huésped en respuesta a la patogénesis y, por lo tanto, constituyen un importante arsenal vegetal contra patógenos fúngicos. Sin embargo, posteriormente, se hizo evidente que las proteínas PR son también inducidas en respuesta a diferentes estreses abióticos (como sequía, sales, frío, metales pesados y luz ultravioleta) y por la aplicación de hormonas vegetales (Ali y col., 2018). Las proteínas PR se clasifican en 17 familias de acuerdo a sus similitudes de secuencia proteica, actividades enzimáticas y otras características biológicas (Ali y col., 2018). Exhiben diversas funciones: actividad β -1,3-glucanasa (PR2), quitinasas (PR3, PR8 y PR11), similares a la taumatina (PR5), peroxidasas (PR9), defensinas (PR12) y tioninas (PR13), entre otras y habitualmente se encuentran en numerosas isoformas (Sels y col., 2008).

Respecto a las proteínas PR5, se cree que están implicadas en el aumento de la permeabilidad de la membrana fúngica, pudiendo provocar la rotura osmótica de la misma (Enoki y Suzuki, 2016). Se reportó que la acumulación de proteínas similares a la taumatina de *Vitis vinifera* protegieron a la uva de antracnosis (Jayasankar y col., 2003). En cereales, varios genes codificantes para proteínas PR5 fueron regulados positivamente por estreses tales como sequía, térmico, salinos, y algunos presentaron elementos de respuesta a hormonas vegetales en sus regiones promotoras (Sharma y col., 2020). Frutillas infectadas con *C. acutatum* indujeron genes pertenecientes a la familia PR5 (*Falpr5-1* y *Falpr5-2*) en frutos de cultivares muy

susceptibles (cultivar Camarosa) y moderadamente susceptibles (cultivar Andana), siendo el patrón de expresión más fuerte y/o más rápido en el cultivar menos susceptible (Casado-Díaz y col., 2006).

Quitinasas (EC 3.2.1.14)

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan el enlace β -1,4-glucósido de la quitina y también la forma desacetilada de la quitina, que se conoce como quitosano. La quitina y el quitosano son abundantes en hongos y en algunas paredes de células de algas, en bacterias y en el exoesqueleto de invertebrados (Grover, 2012). Son miembros del grupo PR, y están clasificadas en grandes subfamilias: las quitinasas de las clases Ia, III y VI se encuentran localizadas en las vacuolas, mientras que las quitinasas pertenecientes a las clases Ib, II, IV, V y VII son secretadas al apoplasto (Kasprzewska, 2003). Considerando la ubicación celular, se han propuesto diferentes mecanismos de acción de las mismas asociados a la defensa. Las quitinasas extracelulares serían parte de una respuesta inducida tempranamente, y podrían actuar directamente bloqueando el crecimiento de las hifas y posiblemente también de manera indirecta liberando elicitores que inducirían otras reacciones de defensa en el hospedador (Kasprzewska, 2003). Por otro lado, las quitinasas vacuolares funcionarían más tarde en el proceso de infección, una vez que las células han colapsado y liberado el contenido vacuolar en el compartimento extracelular (Kasprzewska, 2003).

En frutilla, se detectó un aumento gradual de la actividad quitinasa total durante las primeras 24 h posteriores a la infección con dos patógenos fúngicos (Khan, 2002). Además, la actividad quitinasa total también se indujo cuando las plantas de frutilla se lesionaron o trataron con AS o etileno (Khan, 2002). Se describieron tres genes codificantes para quitinasas, dos de clase II (*FaChi2-1* y *FaChi2-2*) cuyas expresiones se indujeron 2-6 y 24-48 h después de la inoculación de *Colletotrichum fragariae* y *C. acutatum*, respectivamente, y una de clase III (*FaChi3*) (Khan y Shih, 2004). Más recientemente, se reportó la regulación positiva de un gen que codifica para una quitinasa clase IV en frutillas rojas enfrentada a *C. acutatum* (Guidarelli y col., 2011). Asimismo, se informó una inducción de la expresión *FaChi2-2* y *FaChi3* inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C, y un aumento en la actividad quitinasa total 10 h después del tratamiento (Pombo y col., 2011a).

β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39)

Las β -1,3-glucanasas catalizan la hidrólisis del β -1,3-glucano, que es el segundo componente en abundancia de las paredes celulares de los hongos (Balasubramanian y col.,

2012). Las β -1,3-glucanasas están subdivididas en tres grupos: la clase I corresponden a proteínas básicas que se localizan en la vacuola y son sintetizadas como preproteínas sin actividad enzimática hasta que son procesadas, las clases II y III incluyen proteínas ácidas y extracelulares (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Al igual que las quitinasas, las β -1,3-glucanasas poseen una actividad antifúngica directa y una indirecta. La directa se refiere a la capacidad que poseen de catalizar la hidrólisis de los β -1,3-glucanos de las paredes de los hongos, lo que lleva a un debilitamiento de la pared y lisis celular. La indirecta, es debida a los oligosacáridos liberados durante la digestión de la pared, los cuales son percibidos por las plantas como elicitores e inducen posteriores respuestas de defensa (Balasubramanian y col., 2012). Además de su importante rol en la defensa de las plantas, las β -1,3-glucanasas también pueden tener otras funciones biológicas, incluyendo roles en la división celular, germinación de semillas, latencia de las yemas, formación de flores y maduración de los frutos (Balasubramanian y col., 2012).

Se describieron tres β -1,3 glucanasas en frutilla, todas pertenecientes a la clase II (Khan, y col., 2003; Shi y col., 2006). Se reportó que los genes codificantes de endoglucanasas, *Fa β G2,1* y *Fa β G2,3*, se expresaron en fruto y se indujeron cuando los mismos fueron infectados con patógenos fúngicos (Shi y col. 2006). Por otra parte, frutillas irradiadas con luz UV-C mostraron una inducción del gen *Fa β G2,3* después de 24 y 48 h de almacenamiento (Pombo y col., 2011a).

Proteínas inhibidoras de poligalacturonasas fúngicas (PGIP)

Las poligalacturonasas fúngicas se encuentran entre las primeras enzimas que se secretan tras la infección fúngica, y su acción es un requisito previo para el acceso de otras enzimas que degradan la pared celular. Las PGIP son partículas oligoméricas (10-15 monómeros), unidas por interacciones iónicas a la matriz extracelular de las células vegetales, que interfieren específica y eficazmente con la actividad PG del patógeno para interrumpir la degradación de los componentes de la pared celular (De Lorenzo y Ferrari, 2002, Shanmugam, 2005).

Mehli y col., (2004), clonaron y caracterizaron un gen codificante para una PGIP (*FaPGIP*), y observaron que la expresión aumentó durante la maduración de los frutos, mostrando la mayor acumulación de ARNm en el estadio rojo, lo cual sugiere una regulación vinculada con el desarrollo del fruto. Los autores evaluaron la expresión de *FaPGIP* en cinco cultivares de frutilla (Elsanta, Korona, Polka, Senga sengana, Tenira), e informaron que el cultivar Polka mostró el mayor nivel de expresión. Asimismo, después de la inoculación con *B.*

cinerea, los cinco cultivares evidenciaron una inducción significativa de *FaPGIP*, lo cual sugirió un rol de este gen en la defensa del fruto. Más tarde, se identificaron siete variantes alélicas de *FaPGIP* (*FaPGIP1a*, *FaPGIP1b*, *FaPGIP1c*, *FaPGIP2a*, *FaPGIP2b*, *FaPGIP2c* y *FaPGIP3*), siendo las dos primeras específicas de fruto, aunque la proporción de *FaPGIP2a* se incrementó con la maduración del fruto (Schaart y col., 2005).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La aplicación de diferentes estímulos abióticos (tratamientos físicos y químicos) en frutilla, provocará cambios en el metabolismo de la pared celular y respuestas de defensa por parte del fruto.

Tratamientos que sean eficaces en prolongar la calidad postcosecha de frutilla, también constituirán herramientas para contribuir a la profundización del conocimiento de las bases moleculares y bioquímicas de las respuestas de defensa de este fruto modelo dentro de la familia de las *Rosaceas*.

3.2. Objetivo General y Específicos

3.2.1. Objetivo general

Profundizar el conocimiento del efecto de estímulos abióticos (tratamientos físicos y químicos) en el metabolismo de la pared celular y en la generación de respuestas de defensa en los frutos de frutilla.

3.2.2. Objetivos particulares

1. Analizar el efecto de diferentes tratamientos postcosecha (térmico, CaCl_2 y 1-MCP) en el contenido de los diferentes polímeros de pared, así como en la actividad de enzimas y expresión de genes involucrados en el metabolismo de la pared celular de frutilla.
2. Caracterizar el efecto de dichos tratamientos en la expresión de genes y actividad de enzimas vinculadas con mecanismos de defensa del fruto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Previo al comienzo del trabajo experimental de la presente Tesis doctoral, en el Laboratorio se contaba con frutillas del cultivar Aroma cosechadas en estadio de madurez comercial sometidas a los tratamientos postcosecha térmico, CaCl_2 y 1-MCP, así como con una caracterización preliminar del efecto de los tratamientos en algunos parámetros de calidad de los frutos.

Durante el trabajo de la presente Tesis, se utilizaron los frutos preexistentes en el Laboratorio, y se continuó con la evaluación del efecto de los tratamientos postcosecha sobre otros parámetros de calidad, así como con el estudio bioquímico y molecular del efecto de los mismos en el metabolismo de la pared celular y respuestas de defensa del fruto. Cabe mencionar que las metodologías llevadas a cabo dentro del grupo de investigación como antecedentes del presente trabajo de Tesis, están descriptas en las secciones 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 y, a partir de la sección 4.8, son seguidas de aquellas llevadas a cabo durante el desarrollo de la Tesis.

4.1. Material vegetal

Se cosecharon frutos de frutillas (*Fragaria x ananassa*, Duch, cv Aroma) en estadio de madurez comercial (80-90% rojo) en campos de productores locales (La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina) a partir de plantas cultivadas de acuerdo a prácticas convencionales. Los frutos se cosecharon cortando el pedúnculo de cada fruto a 3 cm aproximadamente de la base del receptáculo y se transportaron inmediatamente al laboratorio. El cultivar Aroma presenta frutos de firmeza elevada, superior a la reportada para variedades consideradas firmes como Camarosa (Villarreal y col., 2008; Pombo y col., 2009).

4.2. Tratamientos postcosecha

Para cada tratamiento, se cosecharon alrededor de 300 frutos los cuales se clasificaron de acuerdo a forma, tamaño y ausencia de daño, y se distribuyeron en bandejas de plástico. Para cada tratamiento, se utilizaron 7 bandejas para los controles y 7 para los frutos tratados, a razón de 16 frutillas por bandeja. De esta manera, para cada tratamiento se utilizaron 224 frutos. Los tratamientos postcosecha se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones descriptas a continuación.

- **Tratamiento térmico**

Para llevar a cabo el tratamiento térmico (T), las bandejas con los frutos se cubrieron con un film de PVC y se colocaron en una estufa con aire caliente a 45 °C durante 3 h. Las bandejas de frutos controles (C) se mantuvieron en aire a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 3 h.

- **Tratamiento con CaCl₂**

El tratamiento con CaCl₂ (Ca²⁺) consistió en sumergir los frutos en una solución 1% p/v de CaCl₂ a temperatura ambiente durante 0,5 h. Mientras que los frutos controles (C) se incubaron en agua destilada (H₂O_d) a temperatura ambiente por 0,5 h. Posteriormente, los frutos se secaron en aire a temperatura ambiente por 2 h.

- **Tratamiento con 1-MCP**

Las bandejas se ubicaron en dos contenedores herméticos de 80 L. Para el tratamiento con 1-MCP, se agregó en el interior de uno de los contenedores 1-MCP (Smartfresh™, AgroFresh, Buenos Aires, Argentina) (concentración final= 1 µl l⁻¹) y los frutos estuvieron en contacto con el inhibidor de la percepción del etileno por 10 h a 20 °C ± 1 °C. Para el grupo control (C), se aplicaron las mismas condiciones en el segundo contenedor, pero no se incluyó el 1-MCP.

Para cada condición, se separaron tres bandejas de frutos controles y frutos tratados inmediatamente después de los tratamientos (0d). Se registró la firmeza y luego los frutos se cortaron en ocho partes, se congelaron en nitrógeno líquido (N_{2(l)}) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las cuatro bandejas restantes de frutos controles y tratados de los tratamientos térmico y CaCl₂ se almacenaron por 8 días a 4 °C y 2 días a 20 °C (8+2d), y aquellas correspondientes al tratamiento con 1-MCP, 10 días a 4 °C y 2 días a 20 °C (10+2d). Para el caso del tratamiento térmico se registró la pérdida de peso fresco y la aparición de podredumbres. Luego del almacenamiento refrigerado + estantería, se midió firmeza y posteriormente los frutos se cortaron en ocho partes, se congelaron en N_{2(l)} y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

4.3. Firmeza

La firmeza de los frutos se registró con un texturómetro (TA.XTPlus, Stable Micro Systems Texture Technologies, Scardale, NY, USA) usando un cilindro de compresión de

acrílico de 8 mm de diámetro. Los frutos se comprimieron 0,8 mm y se registró la fuerza máxima medida en Newtons (N), desarrollada durante el ensayo. Para cada fruto, se registraron dos medidas, con un ángulo de rotación de 180° entre cada una.

4.4. Contenido de antocianinas

Cinco gramos de frutos congelados se molieron en presencia de $N_{2(l)}$ con mortero y pilón. Del pulverizado resultante se tomaron 0,3 g y se resuspendió en 3 ml de una solución de HCl 1% v/v en metanol y se mantuvo a 0 °C durante 10 min. Se centrifugó por 10 min a 1.500 x g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a $\lambda = 515$ nm. El contenido de antocianinas se expresó como micromoles de pelargonidina-3-glucósido por kilogramo de fruto ($\mu\text{moles kg}^{-1}$; $\text{Emolar} = 3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{m}^{-1}$).

4.5. Pérdida de peso fresco y evaluación de podredumbres

Para el tratamiento térmico, se determinó la pérdida de peso fresco y la aparición de podredumbres en las 4 bandejas de frutos tratados térmicamente y 4 bandejas de controles. Se registró el peso de cada fruto control y tratado inmediatamente después del tratamiento (0d) y cada día durante el almacenamiento de 8 días a 4 °C y 2 días a 20 °C (8+2d). Los resultados se expresaron como porcentaje de peso perdido.

Para el ensayo de desarrollo de podredumbres, la fruta se clasificó de acuerdo a la ausencia (sin podredumbre) o presencia (podredumbre) de crecimiento fúngico macroscópico luego de una evaluación visual de los frutos tratados y controles, al final del almacenamiento (8+2d). El resultado se representó como porcentaje de la fruta catalogada.

4.6. pH y acidez titulable

Para cada condición, 2,5 g de frutos congelados se molieron en presencia de $N_{2(l)}$ con mortero y pilón. El tejido pulverizado se resuspendió en 25 ml de H_2O_d y se centrifugó durante 5 min a 16.000 x g a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se midió el pH de las muestras utilizando un pHmetro (OAKTON pH-700).

Para la determinación de la acidez titulable se realizaron titulaciones de las muestras con NaOH 0,1 M hasta pH= 8,1 (AOAC, 1990), y la misma se expresó como miliequivalentes de H^+ por kilogramo de fruta fresca ($\text{meq } H^+ \text{ kg}^{-1}$). Se analizaron dos muestras independientes por condición y cada muestra se tituló por duplicado.

4.7. Ensayo de crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*

La cepa de *B. cinerea* (B05.10 de la colección de cultivos fúngico del IIB-INTECH IFCC 458/02) se mantuvo diariamente en agar inclinado de papa-dextrosa a 4 °C y se utilizó para cada ensayo. Previo a la inoculación, el micelio se creció en medio Czapek-Dox a 24 °C (glucosa 50 g, NaNO₃ 2 g, KHPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, KCl 0,05 g, FeSO₄·7H₂O 0,05 g, agar 20 g, pH= 5,5-6,0). La curva de crecimiento se construyó transfiriendo un disco de 4 mm² desde el borde de un cultivo de 5 días de crecimiento activo de *B. cinerea* a las placas conteniendo agar 0,8% p/v solidificado y 0,02; 0,1; 0,2 o 2 mg ml⁻¹ de paredes celulares de frutos no tratados. Posteriormente, las placas se incubaron a 24 °C y se midieron las áreas de crecimiento del hongo después de 24, 48 y 72 h. De acuerdo con los resultados de la curva de crecimiento, el siguiente ensayo se llevó a cabo usando 0,2 mg ml⁻¹ de paredes celulares de frutos controles y tratados. Se midió el tamaño de las áreas de crecimiento de *B. cinerea* (en mm²) usando el software Image-Pro®Plus (Media Cybernetics Inc., San Diego, CA), después de 24, 72 y 120 h de almacenamiento a 24 °C. Para el ensayo, se usaron tres extracciones independientes de paredes celulares de frutos controles y tratados y cinco réplicas técnicas.

4.8. Azúcares totales

Cinco gramos de frutillas congeladas se pulverizaron con pilón y mortero en presencia de N_{2(l)}, y 0,4 g del pulverizado se homogeneizaron con 6 ml de etanol 100% v/v. El homogenato se centrifugó a 9.000 x g por 10 min a 4 °C, y una alícuota de 1 ml del sobrenadante se llevó a un volumen final de 50 ml con H₂O_d. Posteriormente, 0,1 ml del extracto se mezcló con 1 ml de antrona 0,2% p/v en H₂SO₄ 72% v/v. La mezcla se agitó y se incubó por 12 min a 100 °C. Las muestras se enfriaron en un baño de agua y hielo. Para cada tratamiento y control, se prepararon tres extractos independientes y el contenido de azúcares totales se midió espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a $\lambda = 625$ nm. Se construyó una curva estándar usando distintos volúmenes de glucosa 0,04% p/v como patrón y los resultados se expresaron como gramos de glucosa por kilogramo de fruto (g kg⁻¹).

4.9. Compuestos fenólicos

Cinco gramos de frutos congelados se pulverizaron en presencia de N_{2(l)} con mortero y pilón. Luego, 1 g del pulverizado se homogeneizó con 6 ml de etanol 100% v/v y la mezcla se centrifugó a 9.000 x g por 15 min a 4 °C. Un mililitro del sobrenadante resultante se llevó a 5 ml con H₂O_d. La solución obtenida se usó para determinar los compuestos fenólicos mezclando 0,1 ml de muestra, 1,16 ml de H₂O_d y 0,15 ml del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. Luego de 5 min

a temperatura ambiente, se agregó 1,5 ml de solución Na_2CO_3 2% p/v en NaOH 0,1 N. Se incubó durante 1 h a 25 °C y se midió la absorbancia a $\lambda = 760$ nm. La curva estándar se construyó usando distintos volúmenes de ácido gálico 10 mg ml^{-1} en etanol 100% v/v, y el contenido de compuestos fenólicos se expresó como gramos de ácido gálico por kilogramo de fruto (g kg^{-1}).

4.10. Aislamiento de los polisacáridos de pared celular

4.10.1. Pared celular

El aislamiento de los polisacáridos totales de la pared celular de frutilla se realizó de acuerdo con D'Amour y col. (1993) con ligeras modificaciones. Cinco gramos de frutos congelados se homogeneizaron con 20 ml de etanol 100% v/v en Omnimixer y luego se incubaron a 100 °C con reflujo durante 30 min. El homogenato resultante se llevó a temperatura ambiente en baño de agua y se filtró al vacío. El residuo sólido se lavó tres veces con 15 ml de etanol 100% v/v y posteriormente, el residuo se secó por 12 h a 37 °C y se registró su peso. Se realizaron tres extracciones independientes de pared celular, las cuales se expresaron como miligramos de Residuos Insolubles en Alcohol (RIAs) por cien miligramos de fruto ($\text{mg RIAs } 100 \text{ mg fruto}^{-1}$).

4.10.2. Pectinas totales

Cincuenta mg de RIAs se resuspendieron en 45 ml de HCl 0,05 M y se incubaron en baño María a 100 °C durante 1 h con reflujo. Posteriormente, se llevó a temperatura ambiente en baño de agua y luego se filtró al vacío. Se lavó el residuo tres veces con 10 ml de HCl 0,05 M, a fin de extraer todas las fracciones pécticas presentes en la pared celular (es decir, pectinas de interacciones débiles, iónicas y covalentes). El filtrado recogido en el Kitasato se pasó a una probeta y se registró el volumen. Las muestras se diluyeron 1/4 con HCl 0,05 M, y 200 μl de cada dilución se mezclaron con 1200 μl de $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Bórax) 0,0125 M en $\text{H}_2\text{SO}_4(c)$ y los tubos se llevaron a baño María durante 5 min. Se enfrió en baño de agua-hielo y posteriormente, se añadieron 20 μl de 3-fenilfenol 0,15% p/v en NaOH 0,5% p/v (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). Se mezcló por vortex y se regresaron los tubos al baño de agua-hielo. Finalmente, se dejaron reposar 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y se volvió a homogeneizar por vortex. Los controles para azúcares no específicos se construyeron de la misma manera, pero se añadieron 20 μl de NaOH 0,5% p/v en lugar de 3-fenilfenol. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron volúmenes variables de ácido galacturónico

(AG) 1 mM, pH= 5,5. La cuantificación de ácidos urónicos se llevó a cabo midiendo la absorbancia a $\lambda= 520$ nm y los resultados se expresaron como mg de AG 100 mg RIAs⁻¹.

4.10.3. Contenido de las fracciones de pectinas, hemicelulosas y celulosa

Cincuenta miligramos de RIAs se resuspendieron en 50 ml de H₂O_d para solubilizar las pectinas de interacciones más débiles (pectinas solubles en agua o PSA). La mezcla se agitó durante 12 h a 20 °C, el homogenato se filtró al vacío y el sólido se lavó tres veces con 5 ml de H₂O_d. Luego, los filtrados obtenidos se agruparon y nombraron como PSA. El residuo sólido se resuspendió en una solución de un agente quelante para solubilizar las pectinas solubles en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o PSE, para lo cual se utilizaron 25 ml de acetato de sodio (NaAc) 0,05 M conteniendo EDTA 0,04 M, pH= 4,5 y se agitó por 4 h a 20 °C. El homogenato se filtró al vacío y el sólido se lavó tres veces con 2,5 ml de la misma solución. Los filtrados se agruparon y nombraron como PSE. El residuo sólido se resuspendió en 25 ml de HCl 0,05 M y se calentó a 100 °C con agitación por 1 h para hidrolizar los enlaces covalentes y liberar las pectinas ligadas mediante dicho tipo de unión (pectinas solubles en HCl o PSH). Los homogenatos se enfriaron y filtraron al vacío, y el residuo se lavó tres veces con HCl 0,05 M. Los filtrados se agruparon y nombraron como PSH.

Cada una de las fracciones correspondientes a pectinas se cuantificó a través del método del 3-fenilfenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). Cada una de las fracciones resultantes se mezclaron con 1.200 μ l de Bórax 0,0125 M en H₂SO_{4(c)}, y luego se procedió de igual manera a lo descrito previamente para pectinas totales. La curva de calibración se construyó utilizando diferentes volúmenes de AG 1 mM, pH= 5,5. Los resultados se expresaron como mg de AG 100 mg de RIA⁻¹.

Para la extracción de hemicelulosas y celulosa, el residuo sólido resultante de la extracción de las fracciones pécticas se mezcló con 50 ml NaOH 4 M y se agitó por 8 h a 20 °C. El homogenato se filtró al vacío y se lavó tres veces con 5 ml de NaOH 4 M. Se registró el volumen filtrado, y se lo denominó como fracción de hemicelulosas. El sólido remanente se consideró como celulosa. Las fracciones correspondientes a hemicelulosas y celulosa se hidrolizaron completamente con H₂SO₄ 66% v/v a 37 °C por 1 h y se cuantificaron a través del método de la antrona utilizando cantidades variables de glucosa 0,04% p/v para construir una curva de calibración (D'Amour y col., 1993). Los resultados se expresaron como miligramos de glucosa cada 100 miligramos de RIAs (mg glucosa 100 mg RIAs⁻¹).

4.10.4. Azúcares neutros

El contenido de azúcares neutros (AN) en pectinas totales (Sección 4.10.2.) se estimó por el método de la antrona utilizando glucosa como estándar (D'Amour y col., 1993). Los resultados se expresaron como mg glucosa 100 mg RIAs⁻¹.

4.11. Hidratación *in vitro* de las paredes celulares

Cinco miligramos de RIAs se resuspendieron en 2 ml de H₂O_d estéril. Las muestras se homogeneizaron y se agitaron horizontalmente por 24 h a 22 °C. Los tubos se posicionaron verticalmente y el sólido hidratado se dejó decantar a 4 °C durante 6 h. Se evaluó la hidratación de las paredes celulares en base a la altura de los sedimentos de los estratos de los RIAs, de acuerdo con Villarreal y col., (2016). Para cada condición se utilizaron tres extracciones independientes de RIAs.

4.12. Grado de esterificación

El grado de esterificación (GE) se define como la relación entre el metanol liberado y el contenido de pectina expresado como AG, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$GE = \left(\frac{\text{moles de metanol}}{\text{moles de AG}} \right) \times 100$$

El GE de pectinas totales se determinó de acuerdo a Galetto y col., (2010) con leves modificaciones. Sesenta miligramos de paredes celulares obtenidas como Residuos Insolubles en Alcohol (RIAs) se resuspendieron con 25 ml de buffer K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH= 7,5 y se agitó durante 30 min para favorecer la solubilización. Para la liberación del metanol por hidrólisis alcalina, se añadieron 25 ml de KOH 1 M y se incubó por 30 minutos a 25 °C. Los hidrolizados se neutralizaron con H₃PO₄ pH= 7,5 y luego se diluyeron a 100 ml. Se promovió la oxidación del metanol a formaldehído mediante el uso de la enzima Alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13) para lo cual se añadió una solución de enzima 1 U/ml, en relación 1:1 v/v y se incubó durante 20 min a 25 °C. Con el fin de condensar el formaldehído y obtener un producto coloreado, se añadió 2,4-pentanediona 0,02 M, se incubó durante 20 min a 60 °C, se dejó estabilizar durante 15 min a 25 °C, y se midió la absorbancia a $\lambda = 412$ nm. La curva estándar se construyó utilizando diferentes cantidades de metanol (MetOH). El GE se expresó como la razón entre los moles de MetOH liberados luego de la hidrólisis alcalina de pectinas totales cada 100 mg de RIAs, y los moles de AG cada 100 mg de RIAs (mmoles MetOH moles AG⁻¹).

4.13. Actividad total de enzimas involucradas en el metabolismo de pared celular

Para cada medida enzimática, se prepararon tres extractos independientes de frutos tratados y controles, ambos inmediatamente después de los tratamientos como luego del almacenamiento refrigerado + estantería. La actividad enzimática de cada extracto se midió por duplicado.

4.13.1. Pectin metilesterasa

La actividad PME total se midió de acuerdo a Vicente y col., (2005) con modificaciones. Cinco gramos de fruta congelada se homogeneizaron con 15 ml de NaCl 1 M y PVPP (polivinilpolipilorriona) 1% p/v. La suspensión se llevó a agitación por 4 h a 4 °C y luego, se centrifugó a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó, se ajustó su pH a 7,5 utilizando NaOH 0,1 M y se utilizó para el ensayo de actividad enzimática en una mezcla conteniendo 30 µl de extracto enzimático, 185 µl de pectinas cítricas parcialmente metiladas (\geq 85% esterificadas) a pH= 7,5 (como sustrato enzimático), 45 µl de azul de bromotimol 0,01% en buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH= 7,5 y 40 µl de H_2O_d pH= 7,5. Se siguió espectrofotométricamente la reducción de la DO (densidad óptica) a $\lambda= 620$ nm por 30 min manteniendo la mezcla de reacción a 37 °C. Se construyó una curva de calibración usando diferentes volúmenes de AG 0,01 M, pH= 7,5 como estándar. La actividad PME se expresó como µmol de AG demetilado generado por segundo por kilogramo de fruto ($\mu\text{mol s}^{-1} \text{kg}^{-1}$).

4.13.2. Poligalacturonasa

Se midió la actividad PG total de acuerdo con Villarreal y col., (2008). Cinco gramos de frutillas congeladas se homogeneizaron con 15 ml de buffer ácido acético/acetato de sodio (HAc/NaAc) 0,05 M, PVPP 1% p/v, pH= 6,0. La mezcla se centrifugó a 12.000 x g por 30 min a 4 °C luego de lo cual se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con 15 ml de buffer HAc/NaAc 0,05 M, pH= 6,0, y se centrifugó a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se descartó y la muestra se resuspendió con 15 ml de buffer HAc/NaAc 0,05 M, pH= 6,0 conteniendo NaCl 1M. La mezcla se agitó durante 2,5 h a 4 °C y luego se centrifugó a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó por 8 h con buffer HAc/NaAc 0,05 M, pH= 6,0 a 4 °C. El extracto dializado se utilizó para determinar la actividad PG total en una mezcla conteniendo 700 µl de extracto dializado y 700 µl de ácido poligalacturónico 0,3% p/v en HAc/NaAc 0,05 M, pH= 6,0. La reacción colorimétrica se ensayó utilizando 100 µl de mezcla enzimática, tetraborato de sodio 0,1 M, pH= 9,0 y 2-cianoacetamida 1% p/v en un volumen total de 1,1 ml, y se utilizó para medir la absorbancia a $\lambda= 270$ nm. Se

construyó una curva de calibración usando diferentes volúmenes de AG 0,001 M como estándar. Los resultados se expresaron como nmol de AG liberado por segundo y por kilogramo de fruto ($\text{nmol s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$).

4.13.3. β -D-xilosidasa y β -galactosidasa

La actividad β -Xil total se midió de acuerdo con Villarreal y col., (2010), mientras que la actividad β -Gal total se ensayó de acuerdo con Trainotti y col., (2001), con ligeras modificaciones. Cinco gramos de frutillas congeladas se homogeneizaron con 15 ml de buffer NaAc/HAc 0,05 M, NaCl 1 M, PVPP 1% p/v, pH= 6,0. La mezcla se agitó por 2 h a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se reservó para determinar ambas actividades enzimáticas.

Para determinar la actividad β -Xil, una mezcla de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosido, buffer NaAc/HAc 0,05 M, pH= 4,5 y extracto enzimático se usaron en un volumen final de 1,5 ml. Por otro lado, para la actividad β -Gal, se usaron p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido 0,03M, buffer NaAc/HAc 0,05 M, pH= 4,5 y extracto enzimático en un volumen final de 2 ml. La mezcla se incubó a 40 °C. Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos usando 500 μ l de Trizma base 1% p/v y 500 μ l de Na_2CO_3 0,4 M para β -Xil y β -Gal, respectivamente. Para ambas actividades, se midió la absorbancia a $\lambda= 410$ nm, y la curva de calibración se construyó utilizando diferentes cantidades de p-nitrofenol 1 mM (Fluka) como estándar. Las actividades β -Xil y β -Gal se expresaron como nmoles de p-nitrofenol liberado por segundo por kilogramo de fruto ($\text{nmol s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$).

4.13.4. α -L-Arabinofuranosidasa

La actividad α -Ara total se midió como describieron Rosli y col., (2009). Cinco gramos de frutillas congeladas se homogeneizaron con 30 ml de buffer NaAc/HAc 0,05 M, pH= 6,0, NaCl 1 M, Triton X-100 0,05% v/v, EDTA 10 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo) 2 mM, PVPP 1% p/v. Las muestras se agitaron por 4 h a 4 °C, y luego se centrifugaron por 30 min a 10.000 x g a 4 °C. El sobrenadante retenido se usó para determinar la actividad α -Ara, usando 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosido como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 300 μ l de 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosido 3 mM en buffer ácido cítrico/citrato de sodio 150 mM, pH= 4,5, y 250 μ l de extracto enzimático. La mezcla se incubó a 37 °C, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y la reacción se detuvo congelando las muestras en $\text{N}_2(l)$. Para la detección del 4-nitrofenol liberado, a 50 μ l de mezcla de reacción se adicionaron 150 μ l de Na_2CO_3 0,4 M. Se midió la absorbancia a $\lambda= 410$ nm y se construyó una curva de calibración

con cantidades variables de p-nitrofenol como estándar. La actividad α -Ara se expresó como nmoles de p-nitrofenol liberado por segundo por kilogramo de fruto ($\text{nmol s}^{-1} \text{kg}^{-1}$).

4.14. Actividad total de enzimas vinculadas con respuestas de defensa

Para cada medida enzimática se prepararon tres extractos independientes de frutos tratados y controles, ambos inmediatamente después de los tratamientos como luego del almacenamiento en refrigerado + estantería. La actividad enzimática de cada extracto se midió por duplicado.

4.14.1. Fenilalanina amonio liasa (PAL)

Se homogeneizaron 10 g de frutillas congeladas con 40 ml de solución reguladora de extracción (Bórax 0,1 M; 2-mercaptoetanol 5 mM; EDTA 2 mM; PVPP 3% p/v; pH= 8,8). La mezcla se agitó por 1 h a 4 °C y posteriormente, se centrifugó durante 20 min a 10.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para medir la actividad PAL usando la siguiente mezcla de reacción: 2.550 μl de Bórax 0,03 M, pH= 8,8; 450 μl de L-fenilalanina 0,01 M en solución Bórax 0,03 M, pH= 8,8; y 1.500 μl de extracto. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. La reacción se detuvo sumergiendo la mezcla en un baño de hielo. Se midió la absorbancia a $\lambda= 290 \text{ nm}$ y la actividad PAL total se expresó como variación de DO por segundo y por kilogramo de fruto ($\Delta\text{DO s}^{-1} \text{kg}^{-1}$).

4.14.2. Quitinasa

Se homogeneizaron 5 g de frutillas congeladas en un Omnimixer con 15 ml de buffer NaAc/HAc 50 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 2% p/v. La mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C por 3 h y se centrifugó 30 min a 12.000 x g a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la medida de actividad quitinasa en la siguiente mezcla de reacción: 370 μl de Chitin azure (Sigma) 2 mg ml^{-1} y 1105 μl de extracto. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C con agitación y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. La reacción se detuvo con el agregado de HCl 2 N y posteriormente congelando con $\text{N}_2(l)$. Se midió la absorbancia a $\lambda= 575 \text{ nm}$ y la actividad quitinasa total se expresó como $\Delta\text{DO s}^{-1} \text{kg}^{-1}$.

4.14.3. β -1,3-glucanasa

Los extractos enzimáticos se prepararon en las mismas condiciones que las utilizadas en la medición de actividad quitinasa (sección 4.14.2). Para la medición de la actividad β -1,3-glucanasa se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 350 μl de Laminarin azure (Sigma) 1% p/v

y 1.050 μL de extracto. La mezcla se incubó a 37 °C con agitación. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se detuvo la reacción con el agregado de etanol 100% v/v y posterior congelado con $\text{N}_2(\text{l})$. Se midió la absorbancia a $\lambda = 575 \text{ nm}$ y la actividad β -1,3-glucanasa total se expresó como $\Delta\text{DO s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

4.14.4. Polifenoloxidasas (PPO)

Los extractos se prepararon con el siguiente buffer de extracción: Na_2HPO_4 0,02 M; NaH_2PO_4 0,08 M; Tritón X-100 0,1% v/v; NaCl 1 M; PVPP 3% p/v, pH= 6,0. Se homogeneizaron 10 g de frutos con el buffer de extracción y luego se incubó la mezcla con agitación magnética durante 1 h a 25 °C. Posteriormente, se centrifugó 20 min a 12.000 x g a 4 °C y se tomó el sobrenadante para realizar los ensayos de medición de actividad enzimática. Se mezclaron 950 μL de solución reguladora Na_2HPO_4 0,02 M/ NaH_2PO_4 0,08 M; 150 μL de pirocatecol 20 mM y 400 μL de extracto. La mezcla se incubó a 30 °C y la actividad PPO total se evaluó midiendo el incremento de DO a $\lambda = 410 \text{ nm}$. Los resultados se expresaron como $\Delta\text{DO s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

4.14.5. Peroxidasa (POD)

Se prepararon los extractos del mismo modo que para la actividad PPO total (sección 4.14.4).

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Na_2HPO_4 0,02 M/ NaH_2PO_4 0,08 M, pH= 6,0; pirocatecol 20 mM; 100 μL de extracto de enzima y se agregó H_2O_2 4 mM para comenzar la reacción. La mezcla se incubó a 30 °C en baño de agua y la actividad POD total se evaluó midiendo el incremento de DO a $\lambda = 470 \text{ nm}$ y los resultados se expresaron como $\Delta\text{DO s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

4.15. Expresión relativa por ensayos de PCR en Tiempo Real

4.15.1. Extracción de ARN total

Los frutos de frutilla constituyen un tejido vegetal que, por su gran contenido de compuestos fenólicos y pectinas, dificulta la extracción del ARN total. Por estos motivos, se procedió a la extracción aplicando la técnica del 2-butoxietanol (2-BE) (Manning y col., 1991). Previo al proceso de extracción de ARN total, se prepararon y esterilizaron las soluciones a utilizar en el protocolo. Para cada condición y tiempo evaluado, la extracción del ARN total se realizó por quintuplicado. Para ello, 5 g de tejido se pulverizaron con pilón y mortero en presencia de $\text{N}_2(\text{l})$. Se tomaron 0,2 g de tejido los cuales se homogeneizaron en tubos para

microcentrífuga de 2 ml, con 900 µl de buffer de extracción (Tris 0,2 M, EDTA 0,01 M, pH= 7,6 ajustado con H₃BO₃) preparado en agua mili Q, 45 µl de SDS (dodecilsulfato sódico) 10% p/v y 18 µl de β-mercaptoetanol. Posteriormente, se procedió a la homogeneización del macerado por inversión y vortex y, con el fin de separar ácidos nucleicos de proteínas, se añadió inmediatamente 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (relación 25:24:1) agitando vigorosamente hasta que la mezcla obtuvo un aspecto lechoso. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 20 min a 10.000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó la fase superior (aproximadamente 800 µl) la cual se trasladó a un nuevo tubo para microcentrífuga. Se adicionaron 26,7 µl de NaAc 3M (cf= 80 mM; pH= 5,2), se completó hasta un volumen final de 1 ml con agua mili Q, y se mezcló por inversión. Posteriormente, se añadieron 0,4 volúmenes (400 µl) de 2-BE a 4 °C y se mezcló por inversión y vortex. Se incubó durante 30 min a 0 °C, para permitir la precipitación de pectinas y se centrifugó durante 20 min a 10.000 x g a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 0,6 volúmenes de 2-BE, se mezcló por inversión y vortex y se incubó durante 1 h a 0 °C. En este paso, el 2-BE quedó en proporción 1:1 lo que permitió que precipiten ácidos nucleicos totales. Se centrifugó a 10.000 x g durante 25 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante con micropipeta y se dejó secar el pellet en cámara de 37 °C por 5 min. El pellet se resuspendió en 972 µl de agua mili Q estéril y se agregaron 28,4 µl de NaAc 3M, pH= 5,2 más 400 µl de 2-BE y se mezcló por inversión y vortex. Aquí se continuaron eliminando pectinas que pueden no haberse descartado en los pasos anteriores. Se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 10.000 x g a 4 °C durante 25 min. Se tomaron las dos fases líquidas y se les añadieron 600 µl de 2-BE, quedando nuevamente el 2-BE en relación 1:1 y precipitando, por lo tanto, los ácidos nucleicos. Se incubó a 0 °C durante 1 h y a continuación, se centrifugó a 10.000 x g durante 25 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 900 µl de etanol 70% v/v. Se centrifugó a 16.000 x g a 4 °C durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 700 µl de etanol 100% v/v. Se centrifugó 10 min a 10.000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a 37 °C durante 5 min. Para lograr la precipitación selectiva de ARN total frente a ácidos nucleicos totales, el pellet remanente se resuspendió en 500 µl de agua mili Q permitiendo hidratar durante 15 min en hielo. Luego se añadieron 165 µl de LiCl 12 M homogeneizando mediante pipeteo. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 10.000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 750 µl de etanol 70% v/v. Nuevamente, se centrifugó durante 10 min a 10.000 x g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se procedió a un segundo lavado, pero esta vez con etanol 100% v/v. Se centrifugó 10 min a 10.000 x g a 4 °C y se

descartó el sobrenadante. El pellet se secó a 37 °C durante 4 min y finalmente, el ARN total obtenido se resuspendió en 25 µl de agua mili Q y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

4.15.2. Verificación de la integridad del ARN total

Con el objeto de constatar la integridad del ARN total extraído, se prepararon geles de agarosa de concentración 0,8% p/v en buffer TBE 0,5X. La presencia de dos bandas discretas correspondientes a ARN ribosomales permite determinar que el ARN total extraído no sufrió degradación durante el proceso de extracción. Cada una de las muestras de ARN total evaluadas se procesaron de la siguiente manera: 1,5 µl de suspensión conteniendo ARN total se mezclaron con 1 µl de una dilución 1/500 de Gel Red, agente intercalante que permite visualizar las bandas iluminando el gel con luz UV, y 1 µl de Orange G 6X como buffer de muestra. Las muestras se sembraron en el gel y la electroforesis se llevó a cabo a 70 V durante aproximadamente 30 min en buffer TBE 0,5X. Las bandas correspondientes a los ARN ribosomales se visualizaron utilizando un transiluminador-UV (Fotodyne Incorporated).

Composición de las soluciones utilizadas:

TBE 5X (solución madre)

- 54,0 g Tris base, pH= 7,0
- 27,5 g Ácido Bórico (H_3BO_3)
- 20,0 ml EDTA 0,5 M, pH= 8,0
- Agua destilada, cantidad suficiente para 1 litro

Buffer Muestra 6X

- 60 mg de Orange G.
- Glicerol 30% v/v en cantidad suficiente para 50 ml.

4.15.3. Cuantificación del ARN total extraído

La concentración del ARN total se determinó espectrofotométricamente utilizando la función NanoDrop del equipo Synergy H1 Hibrid Reader (Biotek) midiendo la absorbancia a $\lambda= 260$ nm.

4.15.4. Tratamiento con ADNasa y posterior purificación

Con el objetivo de obtener ARN total libre de ADN genómico, se procedió al tratamiento con ADNasa. Para ello 1 µg de ARN total extraído se trató con 1 µl de ADNasa I (5' exonucleasa; 1 U/µl; Promega), 1 µl de buffer para ADNasa I 10X y agua mili Q hasta llegar a un volumen final de 10 µl y se incubó durante 30 min a 37 °C. Para detener la reacción, se agregó 1 µl RQ1 DNasa Stop Solution que es una solución que contiene un inhibidor de exonucleasas (EGTA 0,02 M, pH= 8,0; Promega). Se incubó 15 min a 65 °C en baño de agua, luego durante 3 min en hielo y se centrifugó 10 segundos a 16.100 x g a 4 °C. Posteriormente, se procedió a la eliminación de la ADNasa y purificación del ARN total para lo cual se agregó agua mili Q alcanzando un volumen final de 100 µl y luego se agregó un volumen de cloroformo:octanol (24:1). Se agitó por inversión y vortex y se centrifugó 1 min a 16.100 x g a 4 °C. Se tomó la fase acuosa y se adicionaron 2 volúmenes de etanol 100% v/v, 1 volumen de NaAc 3 M, pH= 5,8 y se dejó precipitando toda la noche a -80 °C. Posteriormente, se centrifugó a 13.400 x g a 4 °C durante 20 min. Se lavó el pellet con etanol 70% v/v y se centrifugó nuevamente durante 10 min a 4 °C a 16.100 x g. El sobrenadante se descartó y se realizó un nuevo lavado con etanol 100% v/v. Luego se centrifugó 10 min a 4 °C a 16.100 x g, se descartó el sobrenadante y se secó en cámara de 37 °C durante 4 min. El pellet correspondiente a ARN total purificado se resuspendió en 15 µl de agua mili Q.

4.15.5. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se utilizó el ARN total purificado (sección 4.15.4) y se agregaron 0,2 µl de hexámeros (330 pmoles, Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Las muestras se colocaron por 10 min en un baño a 70 °C permitiendo que los hexámeros hibriden con secuencias complementarias a las cadenas de ARN. Luego, se incubó en hielo durante 2 min y posteriormente a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó 1 µl de transcriptasa reversa M-MLV RT (200 U µl⁻¹; Promega), 0,5 µl de dNTPs (ci= 2,5 mM), 5 µl de buffer Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM, pH= 8,0 y agua mili Q hasta alcanzar un volumen total de 25 µl. Se incubó a 38 °C durante 1 h, seguido por 5 min a 95 °C en un termociclador (MJ Research).

4.15.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR control)

Para verificar que la síntesis de ADNc ocurrió correctamente, se procedió a la realización de una PCR control sobre cada una de las muestras. Para ello se utilizaron cebadores (oligonucleótidos) específicos para el gen de referencia *FaGADPHI* (gen que codifica una

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de frutilla, EC: 1.2.1.12). Para la reacción de PCR se utilizaron: 0,5 µl de molde (ADNc), 0,375 µl de solución de cada cebador *FaGADPHI*, sentido (Fw) y reverso (Rv) (ci= 10 µM), 1,5 µl de buffer 10X de reacción Taq polimerasa, 0,075 µl de Taq polimerasa (5 U/µl), 0,3 µl de dNTPs (ci= 2,5 mM), 0,9 µl de solución de MgCl₂ (ci= 25 mM) y agua mili Q hasta alcanzar un volumen final de 15 µl. Se adicionó un blanco de reacción, el cual no poseía ADNc molde.

Se utilizó el siguiente programa de PCR: 1. Desnaturalización inicial: 95 °C, 4 min. 2. Desnaturalización: 94 °C, 45 segundos. 3. Anillado: 60 °C; 30 segundos. 4. Elongación: 72 °C; 30 segundos. 5. Elongación final: 72 °C; 7 min. Los puntos 2, 3 y 4 se repitieron 40 veces.

4.15.7. Visualización de los productos de PCR

Los productos de la amplificación utilizando los cebadores *FaGAPDH1* se visualizaron en un gel de agarosa de concentración 0,8% p/v preparado en buffer TBE 0,5X. Además de las muestras y el blanco correspondiente, se sembró un marcador de peso molecular correspondiente a 50 pb (PBL, Productos Biológicos). La presencia de bandas discretas de un tamaño de 96 pb permitió determinar la presencia de ADNc. Cada una de las muestras se procesaron de la siguiente manera: 15 µl del producto de PCR se mezclaron con 1,2 µl de Gel Red (utilizándose una dilución 1/500 de la solución madre) y 3 µl de Orange G 6X. Para la siembra del marcador de peso molecular se utilizaron 7 µl del marcador y 1,2 µl de Gel Red. Las muestras se sembraron en el gel y la electroforesis se realizó a 70 V durante aproximadamente 40 min en buffer TBE 0,5X.

4.15.8. Análisis de la expresión relativa mediante PCR en Tiempo Real

Previo a la realización de los ensayos para evaluar la expresión relativa de distintos genes de interés, se estimó la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos utilizados. Para ello se procedió a la obtención de las curvas de eficiencia en el equipo Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), realizando previamente una serie de diluciones usando como molde ADNc de muestras de frutilla del cultivar Aroma en los estadios 50%-100% rojo.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando Fast Start 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 segundos y 60 °C durante 1 min; y posteriormente, una curva de disociación (o melting) de 60 °C a 95 °C con incrementos de 0,3 °C. Se midió la

fluorescencia al final de cada paso de la amplificación. En cada experimento, los niveles de expresión relativa correspondieron al promedio de cinco extracciones independientes de RNA total, normalizadas con el gen de referencia *FaGAPDH1*. En el caso de la evaluación de genes de defensa, se usó también como referencia el gen *FaUBQ1* (el cual codifica para una enzima conjugadora de ubiquitina o E2, Fw: 5' CAGACCAGCAGAGGCTTATCTT 3' Rv: 5' TTCTGGATATTGTAGTCTGCTAGGG 3'). Los niveles de expresión se calcularon conforme al método descrito por Pfaffl (2001) y se expresaron en unidades arbitrarias \pm SEM.

A continuación, se detallan las secuencias de los pares de oligonucleótidos utilizados, los números de acceso y la longitud del fragmento amplificado:

Nombre del gen	Secuencia de los oligonucleótidos	Número de acceso	Longitud (pb)
Gen de referencia			
<i>FaGAPDH1</i>	Fw: 5' TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG 3' Rv: 5' AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG 3'	AB363963.1	96
Genes vinculados con el metabolismo de la pared celular			
<i>FaPME1</i>	Fw: 5' CAAGTGCACCCAACTTCTGA 3' Rv: 5' CTGAGCTACCACAACGTCCA 3'	AY324809	123
<i>FaPG1</i>	Fw: 5' AATGTGAGATTCGACAGAGTG 3' Rv: 5' GTGGAAATTTTTGCTGTTAAGTG 3'	DQ458990	72
<i>FaPLA</i>	Fw: 5' GAGGTGGGAGGGAAATGG 3' Rv: 5' ACTTGATGCCGCAGAGGA 3'	AF339025	216
<i>FaPLB</i>	Fw: 5' ATTACTGCTGGTGCTGGTG 3' Rv: 5' ACTGCAAACCTACCAATAA 3'	AF339024	183
<i>FaPLC</i>	Fw: 5' GCGAAAGAGGTGACACATAGA 3' Rv: 5' CCTAGAATAGCTTCTGGAAGTTG 3'	U63550	167
<i>FaGal1</i>	Fw: 5' GCAGCTAATGATTCTGAGTCTC 3' Rv: 5' TCCAGACTCTCCACAATCATC 3'	AJ278703	238
<i>FaGal2</i>	Fw: 5' GCAGTAGGGCTCTATCCATTG 3' Rv: 5' GTCTTCCTTATCTCCCACTG 3'	AJ278704	157

<i>FaGal3</i>	Fw: 5' GAGTTTGTGAAGTTTCTGGAGGAG 3' Rv: 5' CATACTTTGCATGTAGACCTGG 3'	AJ278705	188
<i>FaGal4</i>	Fw: 5' CATGGAATTATGGAGACTCAGAC 3' Rv: 5' GCTCCACAGCTTATGAACTAC 3'	KR189030	112
<i>FaAra1</i>	Fw: 5' CCGATTCCACCCTCTTCAGTCC 3' Rv: 5' AATGGGTCGCCCCGATGCCTG 3'	EF635628	165
<i>FaXyl1</i>	Fw: 5' TGCTACCAGAGATCGACGTG 3' Rv: 5' CAACACCGGCATAGTTTCCT 3'	EU736110	274
<i>FaXTH1</i>	Fw: 5' ACTCTGCTCTTGAGCATAGTGC 3' Rv: 5' GAGCTGAATCTCATTGCCACC 3'	GQ367550	150
<i>FaXTH2</i>	Fw: 5' AGCTTTCTTTTGGGTTCTCTCTC 3' Rv: 5' CCTTAACAACCAAAGCAGATGGT 3'	GQ367551	202
<i>FaExp2</i>	Fw: 5' AGCTAGCTCTCACTTTCTTTCTC 3' Rv: 5' ATCACCACCTCCATCGAAAGTG 3'	AF159563	152
<i>FaExp5</i>	Fw: 5' TCTCGCCCAGCCCGTCTTCCAGCAT 3' Rv: 5' TGGGTTGCCAATTAGTTCTT 3'	AF226702	212
<i>FaXynA</i>	Fw: 5' ATACTTCCTCCAATGGCAAGAG 3' Rv: 5' CAATCCGAACCCAAGCAGATAC 3'	XM004292735	170
<i>FaXynC</i>	Fw: 5' ACGACCGGAGGCAAGAGCAATC 3' Rv: 5' GATGCTGGCCGAGTAGTCATAG 3'	XM004295985	100

Genes vinculados con respuestas de defensa

<i>FaPAL1</i>	Fw: 5' GATGCAAAGGCTAAGGCAAG 3' Rv: 5' AGCCCTAACGCTCTCAACCT 3'	AB360390.1	151
<i>FaCHS2</i>	Fw: 5' GCCTTTGTTTGAGCTGGTCT 3' Rv: 5' CCCAGGAACATCTTTGAGGA 3'	AB201756.1	118
<i>FaPR5</i>	Fw: 5' CCTAATGACACTCCCGAAAC 3' Rv: 5' CCACCGAAGCATGTAAAGAGG 3'	EU289405	122

<i>FaPGIP</i>	Fw: 5' CACACGGGAAATTCGTTGGCACC 3' Rv: 5' CTGGGTCGTCTTGTTCATCC 3'	AF196892	170
<i>FaChi2-2</i>	Fw: 5' GCTCTGGCTATTACCACAAGTC 3' Rv: 5' CCCATTGAAAGATCGAGCAGCAG 3'	AF320111	216
<i>FaChi3</i>	Fw: 5' CAGCACACACAATTTCCCACC 3' Rv: 5' CAAGTCTGTGCTAATGTGCCC 3'	AF134347	188
<i>FaβG2-3</i>	Fw: 5' CCCCTAACAAACAGCCCAAG 3' Rv: 5' CATGGGCGCAAGGCACTC 3'	AY989819	347

4.16. Ensayo de crecimiento *in vivo* de *Botrytis cinerea*

Se destaca que para este ensayo se realizó una nueva cosecha de frutos del cultivar Aroma en el estadio de madurez comercial. Se cosecharon alrededor de 150 frutos los cuales se seleccionaron de acuerdo a tamaño y ausencia de daño, y se desinfectaron con una solución comercial de NaClO 0,2% v/v (55 g de Cl₂ activo L⁻¹). Luego los frutos se dividieron en dos grupos y se procedió a la realización de los tratamientos con CaCl₂ y tratamiento con 1-MCP, de acuerdo a la Sección 4.2. Para cada tratamiento, se utilizaron 24 frutos control y 24 frutos tratados ya sea con CaCl₂ o 1-MCP.

Para la esporulación, las placas con el hongo *B. cinerea*, se mantuvieron de 7 a 10 días en oscuridad a temperatura ambiente. Los conidios se cosecharon con agua estéril conteniendo Tween-20 0,02 ml. l⁻¹, se filtraron y contaron con un hemocitómetro. La concentración del inóculo se llevó a 2 x 10⁴ conidios ml⁻¹ con medio PDB (caldo papa-dextrosa), complementado con KH₂PO₄ 10 mmol l⁻¹ y sacarosa 10 mmol l⁻¹. Antes de la inoculación, los conidios se incubaron durante 2 a 3 h a temperatura ambiente sin agitación. Se inocularon dos gotas de 10 µl sobre la superficie de cada fruto, y los frutos inoculados se incubaron en oscuridad a 20 °C por 6 días. Diariamente se fotografiaron los frutos con una cámara digital y se evaluó visualmente la aparición de señales de lesión macroscópicas. Dichas lesiones se clasificaron de acuerdo al grado de severidad como 1) desarrollo de micelio en la zona de inoculación, 2) lesión incipiente más allá de la zona de inoculación + micelio, 3) lesión moderada más allá de la zona de inoculación + micelio, y 4) síntomas de putrefacción.

4.17. Análisis estadístico

Todos los ensayos para cada tratamiento y control se realizaron por triplicado, exceptuando el ensayo de PCR en Tiempo Real donde se realizaron cinco réplicas por condición.

Los datos del ensayo de podredumbre de los frutos se analizaron por Chi-cuadrado (χ^2) para testear la dependencia entre tratamientos y el desarrollo de podredumbres. Los resultados del contenido de pared celular y sus polímeros se analizaron por t-test de Student.

Los datos correspondientes al resto de los experimentos se analizaron por One-way ANOVA, y las medias comparadas con Tukey como post-test (excepto para Pérdida de peso y Crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, para los cuales se usó el Dunnett como post-test) con un nivel de significancia de 0,05.

Se utilizó el Graph-PadPrism versión 6.0 (GraPhPad, San Diego, CA, USA) para generar los gráficos presentados en las secciones de Resultados de cada Capítulo.

5. CAPÍTULO I: TRATAMIENTO TÉRMICO

5.1. Introducción

El interés por el estudio y la aplicación de tratamientos térmicos para controlar el ataque de patógenos y modificar el proceso de maduración y la respuesta de los frutos carnosos a temperaturas extremas comenzó hace de más de 25 años (Lurie, 1998). Parte de este interés se despertó como una alternativa al uso de químicos para prevenir podredumbres y mantener la calidad de los frutos durante la postcosecha. Asimismo, los efectos de los tratamientos térmicos en aspectos claves de la maduración postcosecha y en el desarrollo de la termotolerancia en los frutos es también de interés desde el punto de vista de la investigación básica.

Existen diversos tipos de tratamientos térmicos entre los que se pueden mencionar tratamientos en los que los frutos son sumergidos (dip) o bien son rociados con agua caliente, tratamientos con vapor caliente y tratamientos con aire caliente (Lurie, 1998).

Los tratamientos térmicos se implementaron con éxito en la postcosecha de frutos como el tomate (McDonald y col., 1995, Aborisade y col., 2002), uva (Shellie y Skaria, 1998) y naranja (Wan y col., 2020) para mantener la calidad de la fruta y reducir los niveles de patógenos y el desarrollo de enfermedades. Es de destacar que el tratamiento térmico se utiliza también previo al almacenamiento refrigerado para disminuir los desórdenes fisiológicos causados por el daño por frío en duraznos y cítricos. En duraznos del cultivar Dixiland se observó que el tratamiento térmico (39 °C durante 3 días) produjo un retraso en la maduración postcosecha de los frutos y en la producción de etileno, y que los frutos tratados térmicamente adquirieron una mayor tolerancia al daño por frío (Lara y col., 2009). El mismo grupo de investigación, estudió la adquisición de esta mayor tolerancia al daño por frío en frutos tratados térmicamente respecto a los controles a través de enfoques bioquímicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos (Lauxmann y col., 2012; Bustamante y col., 2012; Lauxmann y col., 2014). En el caso de cítricos, se aplicó tratamiento térmico (37 °C durante 24 h) a dos variedades de tangor (híbrido entre tangerina y naranja) muy cultivadas en nuestro país (Ellendale y Murcott) con el objetivo de proteger a los frutos del daño por frío que sufren durante el almacenamiento refrigerado (Moreno y col., 2018; Moreno y col., 2020). Los autores observaron que la variedad Ellendale presentó un desarrollo de patógenos significativamente menor luego del tratamiento térmico y durante el almacenamiento refrigerado respecto a los controles y a la variedad Murcott. Los estudios tanto metabolómicos como proteómicos demostraron perfiles diferentes para ambas variedades. Asimismo, los cambios en el proteoma de la variedad más resistente al desarrollo de patógenos (Ellendale) como respuesta al

tratamiento térmico sugirieron modificaciones en el flujo de carbono hacia mecanismos de protección del fruto tales como sistema antioxidante, protección de membranas y estructura de proteínas, y refuerzo de la pared celular.

En el caso de frutilla, García y col., (1995) hallaron que las inmersiones en agua caliente redujeron la descomposición de los frutos del cultivar Tudla, aumentaron el contenido de sólidos solubles y la disminución de la acidez titulable y, por lo tanto, la mejora de los factores clave relacionados con la aceptación sensorial por parte del consumidor. Lara y col. (2006) indicaron que la inmersión en agua caliente de frutillas del cultivar Pájaro demostró ser un medio eficaz para el control de podredumbres de postcosecha, pero debido a los efectos perjudiciales en los aspectos de calidad, como la firmeza y el aspecto visual, este tratamiento no resultaría eficaz para la comercialización de dicho cultivar. En contraste, tratamientos postcosecha utilizando aire caliente en frutillas del cultivar Pájaro no indujeron ningún daño visible en la fruta en comparación con los controles, pero inhibieron sólo parcialmente el desarrollo de infecciones fúngicas (Lara y col., 2006). Por su parte, frutos de frutilla del cultivar Chandler tratados con aire caliente mostraron una firmeza similar en comparación con la fruta sin tratar (Yoshikawa y col., 1992). Vicente y col. (2002) trataron frutillas del cultivar Selva con aire a 45 °C por 3 h y luego las almacenaron a 0 °C durante 0, 7 y 14 días. Posteriormente, almacenaron los frutos a 20 °C y monitorearon diversos parámetros de calidad a las 24, 48 y 96 h. Como resultado, los autores observaron una mayor retención de la firmeza y una disminución de la colonización bacteriana y fúngica, y de podredumbres en general en frutos tratados y almacenados 7 días a 0 °C y 48 h a 20 °C (7d+48h). Asimismo, reportaron que las diferencias entre frutos tratados y control no fueron significativas después de 14 días de almacenamiento en frío. Los frutos tratados y almacenados 7d+48h no modificaron otros parámetros importantes para el consumo (pH, acidez titulable y azúcares totales). Por otro lado, los autores indicaron que sólo las frutillas tratadas y almacenadas durante 7 días a 0 °C y 96 h a 20 °C, retrasaron la acumulación de antocianinas. En otro trabajo, frutillas del cultivar Seascape tratadas térmicamente a 45 °C por 3h disminuyeron el ablandamiento, redujeron la acumulación de antocianinas y el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* respecto a los controles (Pan y col., 2004). Respecto al efecto del tratamiento térmico en el metabolismo de la pared celular de frutilla, se informó que el mismo fue capaz de aumentar la actividad PME y disminuir otras actividades enzimáticas como PG, β -Gal y β -Xil (Vicente y col., 2005; Lara y col., 2006; Martínez y Civello, 2008).

Sin embargo, a pesar de estos importantes aportes, al momento de la realización de la presente Tesis doctoral, no estaba reportado el efecto de la aplicación de este estímulo físico en

el contenido de los distintos polímeros que forman la pared celular primaria frutilla ni en el patrón de expresión de genes relevantes en el metabolismo de la pared y la firmeza de los frutos.

Respecto al efecto de los tratamientos térmicos en la inhibición del desarrollo de patógenos, se informó que los tratamientos térmicos no sólo son capaces de reducir el crecimiento microbiano *per se*, sino que también inducen la resistencia de diversos frutos carnosos al ataque de patógenos (Lurie y Pedreschi, 2014). En cítricos, durazno y tomate se reveló que los cambios efectuados por los tratamientos térmicos involucran la acumulación de proteínas de defensa, incluidas proteínas de choque térmico, PR, dehidrinas y enzimas y compuestos vinculados con procesos antioxidantes (Lara y col., 2009; Lurie y Pedreschi, 2014). En el caso de frutilla, frutos del cultivar Selva cosechados en estadio de madurez comercial revelaron que el tratamiento térmico disminuye la producción de peróxido de hidrógeno y aumenta la actividad superóxido dismutasa (SOD) respecto a los controles (Vicente y col., 2006). Asimismo, se informó que el tratamiento de frutillas a 45 °C por 3,5 h inhibió la germinación de esporas y la elongación del tubo germinal de *B. cinerea* (Jin y col., 2016).

Al igual que en el caso de la información acerca del efecto de los tratamientos térmicos en el metabolismo de la pared celular de frutilla, a pesar de estas contribuciones valiosas, hasta el momento del inicio del presente trabajo, el conocimiento del efecto del estrés térmico sobre la actividad de enzimas y particularmente en la expresión de genes vinculados con la defensa de este fruto eran muy escasos.

De esta manera, el presente Capítulo propone contribuir al conocimiento actual de la respuesta de la pared celular de frutilla y las respuestas de defensa al tratamiento térmico durante la maduración postcosecha, desde un enfoque bioquímico y molecular. El efecto positivo del tratamiento térmico en la preservación de la calidad del fruto se discute en relación a los resultados obtenidos en términos de sus efectos en el contenido de la pared celular y sus distintas fracciones, la hidratación *in vitro* de la pared celular, el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*, y la expresión génica y actividades enzimáticas vinculadas con el metabolismo de la pared y las respuestas clásicas de defensa de los frutos.

5.2. Antecedentes

5.2.1. Firmeza, antocianinas, pérdida de peso fresco, pH y acidez titulable

Previo al presente trabajo de Tesis doctoral, se habían caracterizado algunos parámetros (particularmente aquellos que definen la calidad de frutilla) de frutos tratados y controles, con el fin de determinar si las condiciones del tratamiento térmico fueron efectivas para retrasar la maduración postcosecha (Oviedo y col., 2013).

Inmediatamente después del tratamiento (0d), los frutos controles y los estresados térmicamente presentaron el mismo nivel de firmeza (**Figura 4.A**). Después de 8 días de almacenamiento a 4 °C + 2 días a 20 °C (8+2d), se detectó una disminución en el nivel de firmeza en frutos controles, mientras que la firmeza de los frutos tratados térmicamente permaneció constante respecto a la condición inicial (0d) y fue significativamente mayor que para los controles (**Figura 4.A**).

Se estudió asimismo la acumulación de antocianinas como un parámetro típico usado para seguir la maduración de frutilla durante la postcosecha (Villarreal y col., 2010). No se encontraron diferencias en el contenido de dichos pigmentos entre frutos tratados y controles, a 0d (**Figura 4.B**). Luego del almacenamiento refrigerado + estantería (8+2d), se observó un aumento natural en los niveles de antocianinas tanto en el grupo de frutos control como tratados, pero la acumulación de estos pigmentos fue significativamente menor en frutos sometidos al tratamiento térmico respecto a controles (**Figura 4.B**).

No se observó pérdida de peso fresco ni para el grupo de frutos control ni para el de tratados luego de 1 día a 4 °C (**Figura 4.C**). Después de 4, 6 y 8 días de almacenamiento refrigerado, los frutos control y los tratados térmicamente mostraron una pérdida de peso fresco de entre 1 y 2%, si bien no se observaron diferencias significativas entre ellos. Una vez que los frutos se llevaron a 20 °C, los dos grupos alcanzaron un promedio de 4% de pérdida de peso en fresco y nuevamente, no se observaron diferencias significativas entre controles y tratados térmicamente (**Figura 4.C**).

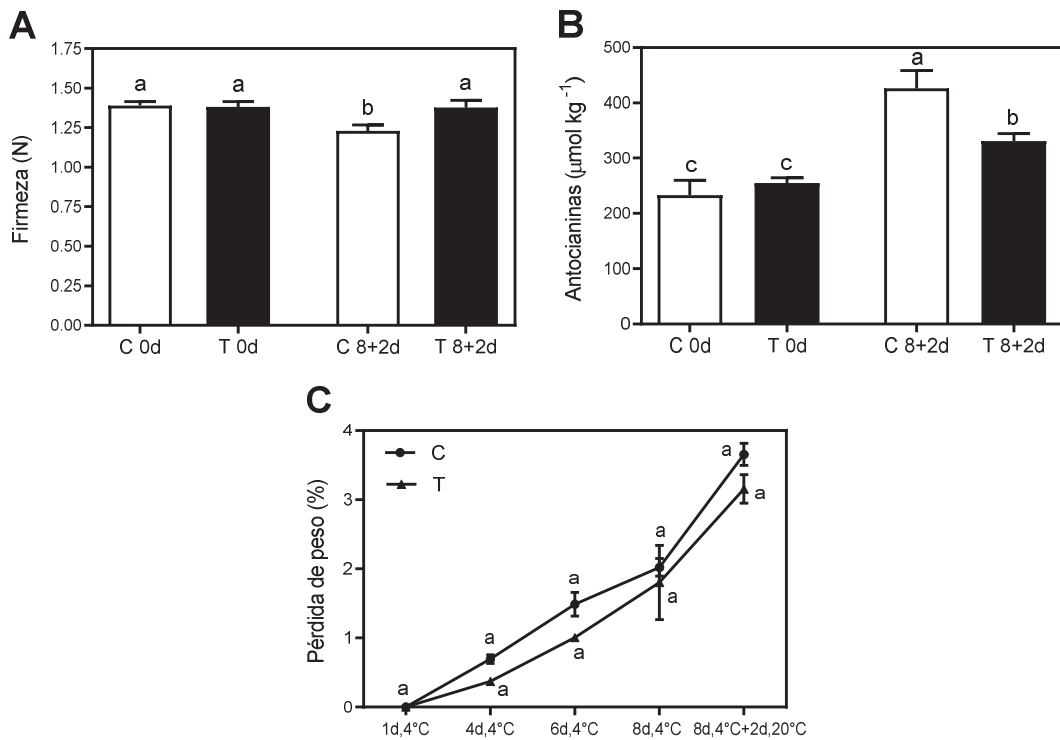


Figura 4. Nivel de firmeza (A), contenido de antocianinas (B) y pérdida de peso fresco (C) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), inmediatamente después del ensayo (0d) y luego de 8 días de almacenamiento a 4 °C + 2 días a 20 °C (8+2d). Las barras representan la media ± error estándar de la media de réplicas. En A y B, los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. En C, los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Dunnett como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre frutos tratados térmicamente y controles a P < 0,05 (Oviedo y col., 2013).

Por otro lado, se observó que el pH del jugo de frutilla no fue modificado significativamente bajo ninguna condición analizada (**Tabla 1**), y tampoco se encontraron diferencias en la acidez titulable (**Tabla 1**). Sin embargo, el tratamiento con aire caliente rindió frutillas con una apariencia externa más saludable que los controles (**Figura 5**).

	Almacenamiento	C	T
pH	0d	2,75 ± 0,09a	2,88 ± 0,12a
	8+2d	2,86 ± 0,14a	2,92 ± 0,21a
Acidez titulable (meq H ⁺ kg ⁻¹)	0d	121,85 ± 7,11a	118,42 ± 14,91a
	8+2d	120,75 ± 19,34a	109,61 ± 24,85a

Tabla 1. pH y acidez titulable en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre frutos tratados térmicamente y controles a $P < 0,05$ (Oviedo y col., 2013).

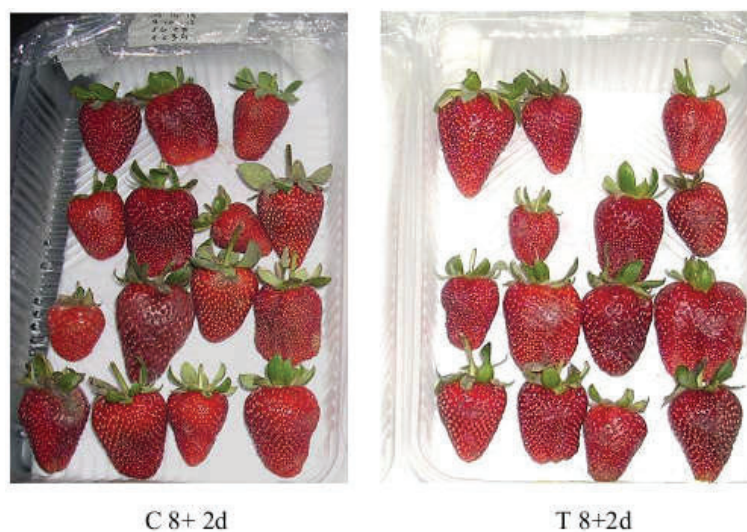


Figura 5. Bandejas de plástico conteniendo frutillas controles (C, izquierda) y frutillas tratadas térmicamente (T, derecha), luego de un almacenamiento de 8 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (8+2d).

5.2.2. Crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* y desarrollo de podredumbres

Como una forma de evaluar el efecto del tratamiento térmico en la accesibilidad de hongos necrotróficos a la pared celular de frutilla, se estudió el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* en placas conteniendo paredes celulares (extraídas como Residuos Insolubles en Alcohol, RIAs) como única fuente de carbono. Como resultado, a cada tiempo analizado (24, 72 y 120 h post-inoculación, hpi), se observó que el área de crecimiento de *B. cinerea* fue significativamente menor cuando se utilizaron paredes celulares aisladas a 8+2d de frutos tratados térmicamente respecto a los controles (**Figura 6.A**).

Asimismo, se evaluó la presencia de podredumbres en frutos tratados térmicamente y frutos controles luego del almacenamiento refrigerado y en estantería (8+2d) (**Figura 6.B**). Si bien el análisis estadístico no indicó diferencias significativas ($\chi^2 = 0,8840$, 1 grado de libertad, P-value = 0,3471) entre frutos tratados y controles, los resultados revelaron que el 20% de los frutos controles mostró podredumbres, mientras que el 13% de los frutos tratados térmicamente fueron afectados (**Figura 6.B**). Se destaca que, si bien el ensayo se realizó en un periodo anterior al presente trabajo de Tesis, el análisis estadístico del mismo se llevó a cabo durante la etapa experimental de la misma.

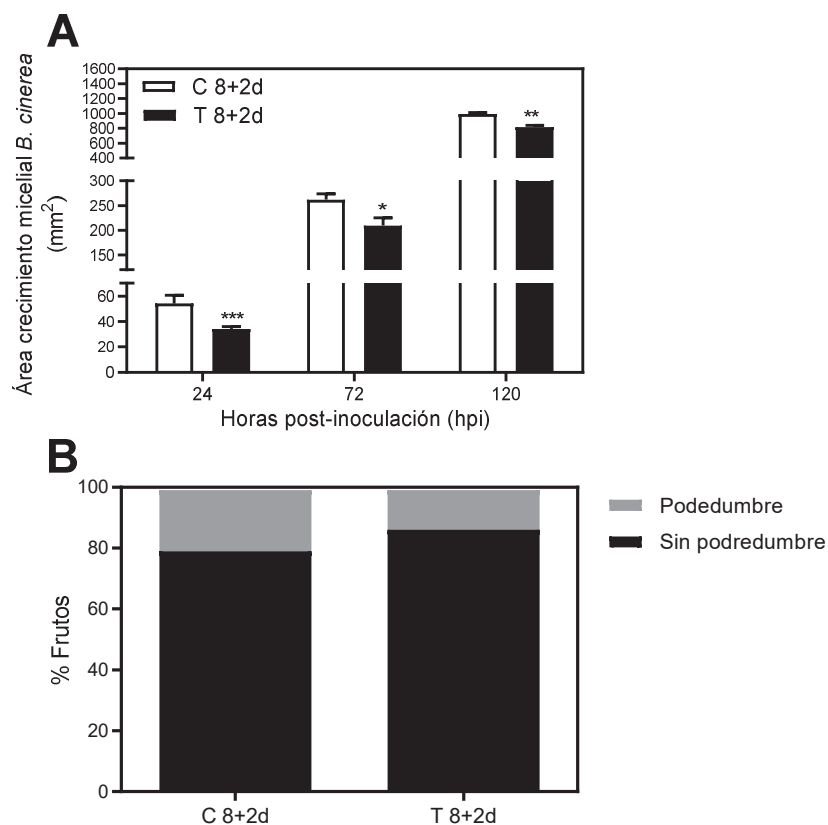


Figura 6. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas conteniendo agar 0,8% p/v homogeneizado con 0,2 mg ml⁻¹ de RIAs como única fuente de nutrientes (A). Desarrollo de podredumbres (B), de frutos controles (C) y frutos tratados térmicamente (T) luego de un almacenamiento de 8 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (8+2d). En A, las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Dunnett como post-test. Asteriscos indican diferencias significativas entre frutos tratados y controles (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001). Los resultados en B se analizaron mediante Chi-cuadrado con $\alpha = 0,05$ y 1 grado de libertad.

5.3. Resultados

5.3.1. Parámetros de calidad del fruto

5.3.1.1. Azúcares y compuestos fenólicos

Con el fin de continuar la caracterización y evaluación de la calidad de frutillas tratadas térmicamente, durante el periodo de trabajo doctoral se procedió con las medidas del contenido de azúcares y compuestos fenólicos totales. Respecto al contenido de azúcares totales, no se observaron diferencias entre frutos tratados térmicamente y controles, tanto inmediatamente después del tratamiento (0d) como después del almacenamiento (8+2d) (Figura 7.A).

El contenido de compuestos fenólicos no se modificó en frutos controles después del almacenamiento (8+2d) respecto a la condición inicial (0d) (**Figura 7.B**). En frutos tratados térmicamente se observó un aumento en el contenido de compuestos fenólicos entre 0d y a 8+2d, y el mismo fue significativamente mayor que en los frutos controles en ambos tiempos estudiados.

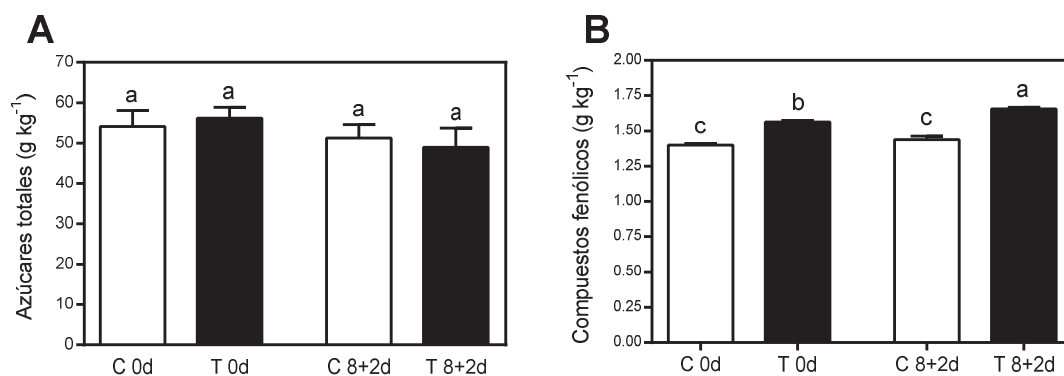


Figura 7. Contenido de azúcares (**A**) y compuestos fenólicos totales (**B**) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla

5.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular

Con el objetivo de evaluar la influencia del tratamiento térmico en el contenido de las distintas fracciones que constituyen la pared celular de frutilla, se realizó un aislamiento secuencial de los principales polisacáridos de pared.

Como se describió en la sección de 5.2.1. de Antecedentes, las diferencias significativas en los niveles de firmeza entre frutos tratados térmicamente y frutos controles se detectaron después del almacenamiento refrigerado + estantería (8+2d). De esta manera, para los estudios del efecto del tratamiento térmico en el contenido de los distintos polímeros de la pared celular, se utilizaron RIAs provenientes de frutos tratados y controles a 8+2d. Sin embargo, se destaca que con el fin de descartar posibles efectos colaterales del tratamiento térmico en el contenido de agua en los frutos (lo cual podría ser traducido como un incremento en el contenido de pared celular por peso de fruto fresco), se analizó el contenido de pared celular al inicio del ensayo (0d) y no se observaron diferencias significativas en el contenido de RIAs entre frutos tratados térmicamente y controles (datos no mostrados en el presente Manuscrito). Luego del

almacenamiento (8+2d), se observó que el contenido total de pared celular fue mayor en frutos tratados térmicamente respecto a los controles (**Figura 8.A**). Asimismo, el contenido de pectinas totales extraídas fue mayor en frutos tratados que en frutos no tratados (**Figura 8.B**).

Los RIAs provenientes de frutos controles y tratados térmicamente se fraccionaron secuencialmente para obtener las pectinas solubles en agua (PSA, o unidas por interacciones débiles), solubles en EDTA (PSE, o unidas por interacciones iónicas) y solubles en HCl (PSH, o unidas por interacciones covalentes), así como hemicelulosas solubles en solución básica y el residuo final de celulosa. Como resultado, se observó que los frutos tratados térmicamente presentaron un contenido significativamente mayor de PSA, PSE y PSH (**Figura 8.C, 8.D y 8.E**, respectivamente) respecto a los controles.

Los análisis del contenido de hemicelulosas (**Figura 8.F**) y de celulosa (**Figura 8.G**) revelaron un contenido significativamente mayor de estos polisacáridos en frutos estresados térmicamente cuando se compararon con los frutos controles.

Finalmente, se determinó el contenido de azúcares neutros sobre pectinas totales y se observó un mayor contenido en frutos tratados térmicamente en comparación con los controles (**Figura 8.H**).

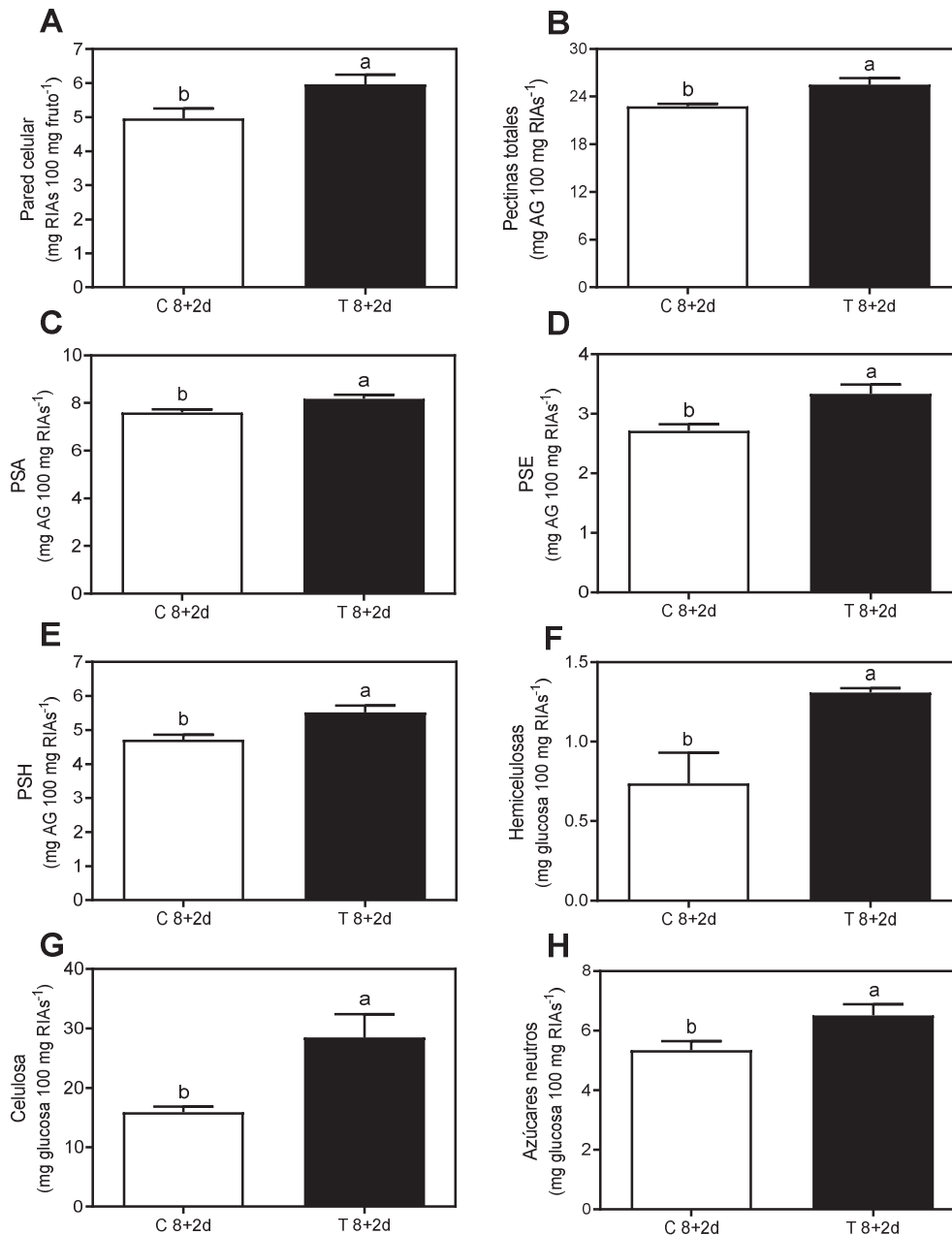


Figura 8. Contenido de pared celular total (extraída como RIAs) por cada 100 mg de fruto (A). Contenido de pectinas totales (B) y de los principales polímeros constituyentes por cada 100 mg de RIAs: PSA (C), PSE (D), PSH (E), hemicelulosas (F), celulosa (G) y contenido de azúcares neutros (H) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas y los resultados se analizaron con el test t-Student. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.2.2. Hidratación *in vitro* de la pared celular

Dado que la hidratación *in vitro* de la pared celular se asocia a un número de características químicas y propiedades particulares de los componentes de la pared celular y lámina media, se decidió evaluar este proceso en frutos de frutilla controles y tratados

térmicamente. Se utilizaron RIAs de frutos tratados y controles, inmediatamente después del tratamiento (0d) y luego del almacenamiento refrigerado + estantería (8+2d). Los RIAs se hidrataron en agua destilada y se agitaron por 24 h, luego de lo cual se dejaron decantar los sólidos hidratados y se midieron las alturas.

Como resultado, se observó la misma hidratación de las paredes celulares en frutos controles y tratados a 0d, mientras que a 8+2d, se halló una hidratación mayor en frutos tratados térmicamente comparado con controles (**Figura 9.A**).

Asimismo, se analizó el proceso de hidratación *in vitro* durante la maduración de frutilla para ser usado de referencia (**Figura 9.B**). Se extrajeron RIAs de frutos del cultivar Aroma en los estadios Verde pequeño (VP), Verde grande (VG), Blanco (B), 50% rojo (50%R), 80% rojo (80%R), 100% rojo (100 %R) y Sobremaduro (SM) y se realizó el ensayo de hidratación de las paredes celulares. En este caso, se observó un incremento progresivo de la hidratación desde los estadios VP a 100%R y luego, se detectó una disminución significativa en el estadio SM (**Figura 9.B**). Cuando se representaron gráficamente las alturas de las paredes hidratadas (**Figura 9.C**), se observó que el grado de hidratación *in vitro* de los RIAs de frutos controles y frutos tratados térmicamente a 0d fue similar al detectado para RIAs de frutos 80%R. Sin embargo, a 8+2d, la hidratación de los RIAs de frutos controles disminuyó al nivel de los frutos SM, mientras que la de los frutos tratados térmicamente se mantuvo a un nivel similar que el inicial (0d) (indicado con recuadros y flechas dentro de la **Figura 9.C**).

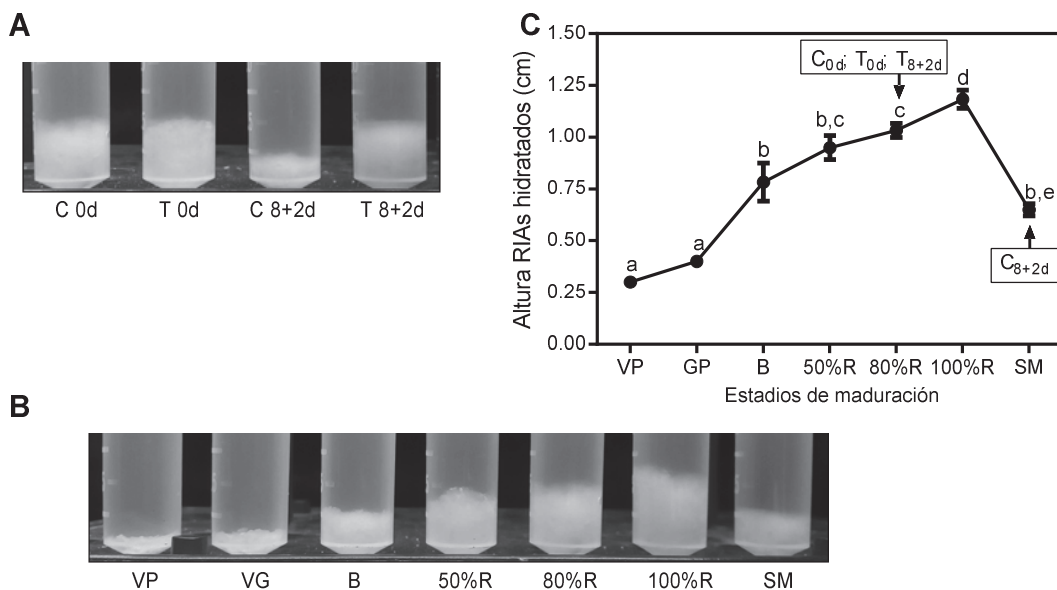


Figura 9. Hidratación *in vitro* de paredes celulares extraídas como RIAs de frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d (A), y en diferentes estadios de maduración del fruto de frutilla (B). Representación gráfica de la altura de los sedimentos de RIAs hidratados de los estadios de maduración de frutilla y, comparación con frutos controles (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y a 8+2d (C). Tanto para A como para B, se utilizaron tres réplicas, y los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresión relativa *FaPME*, *FaPG* y *FaPL*

Para la evaluación del efecto del tratamiento térmico sobre el metabolismo de cadenas principales de pectinas, se realizaron ensayos de actividades enzimáticas y se analizó la expresión de genes vinculados a la modificación de estos polímeros de pared celular y lámina media.

Se observó un aumento en la actividad pectin metilesterasa total tanto en frutos controles como en frutos tratados térmicamente luego del almacenamiento (8+2d) respecto al tiempo inicial (0d), y la misma fue significativamente mayor en frutos tratados térmicamente respecto a los controles en ambos tiempos evaluados (0d y 8+2d) (**Figura 10.A**). Se analizó además el grado de esterificación de pectinas totales aisladas de frutos tratados térmicamente y controles, y se observó un menor GE en pectinas extraídas de frutos tratados tanto a 0d como a 8+2d (**Figura 10.B**). No se detectaron cambios en el nivel de expresión del gen *FaPME1* en frutos controles entre 0d y 8+2d. Sin embargo, el tratamiento térmico aumentó significativamente la expresión *FaPME1* a 0d respecto a los frutos no tratados (**Figura 10.C**). Luego del almacenamiento, si bien se observa una tendencia de mayor expresión *FaPME1* en frutos tratados térmicamente comparados con los controles, la misma no fue significativa (**Figura 10.C**).

Respecto a la actividad poligalacturonasa total, la misma fue significativamente menor en frutos tratados comparado con los controles en los dos tiempos analizados (0d y 8+2d) (**Figura 10.D**). La acumulación del ARNm *FaPG1* se redujo considerablemente en frutos tratados térmicamente a 0d respecto al grupo control (**Figura 10.E**), mientras que luego del almacenamiento (8+2d), la expresión *FaPG1* disminuyó en frutos controles y no se observaron diferencias con los frutos tratados (**Figura 10.E**).

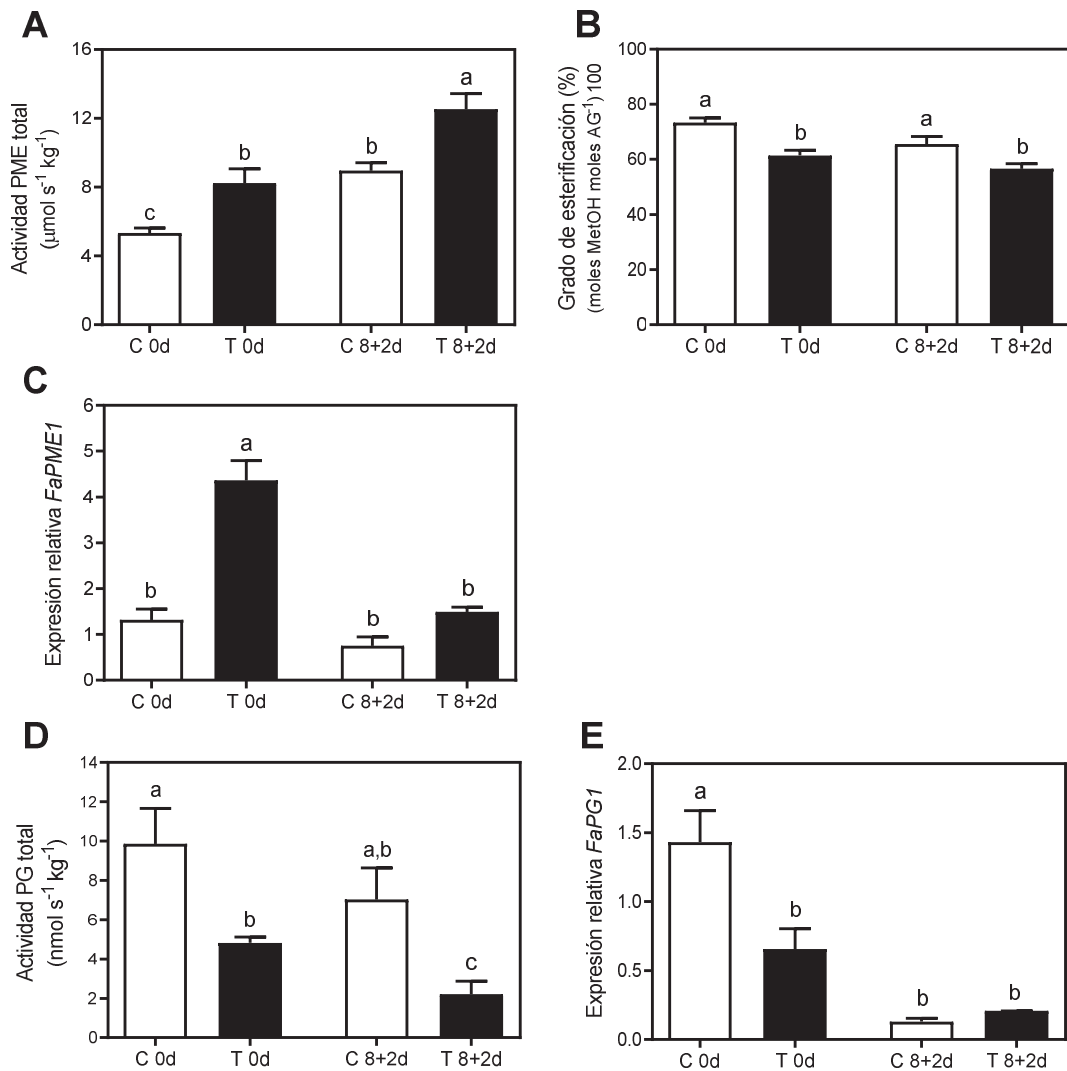


Figura 10. Actividad PME total (A), grado de esterificación (B), expresión relativa de *FaPME1* (C), actividad PG total (D) y expresión relativa *FaPG1* (E) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A, B y D, y de cinco réplicas en C y E. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Para profundizar el análisis del efecto del tratamiento térmico en la expresión de genes que codifican para enzimas del grupo de las pectinasas, se evaluaron las expresiones de tres genes que codifican pectato liasas putativas (*FaPLA*, *FaPLB* y *FaPLC*). La expresión *FaPLA* permaneció sin cambios entre 0d y 8+2d tanto para los frutos controles como para los frutos

tratados térmicamente, y tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos (**Figura 11.A**). No obstante, a 0d el tratamiento térmico provocó una regulación negativa de las expresiones *FaPLB* y *FaPLC* respecto a los frutos no tratados (**Figuras 11.B** y **11.C**, respectivamente). A 8+2d, se observó una disminución de las expresiones *FaPLB* y *FaPLC* en frutos controles y no se detectaron diferencias significativas con los tratados térmicamente (**Figuras 8.B** y **8.C**, respectivamente).

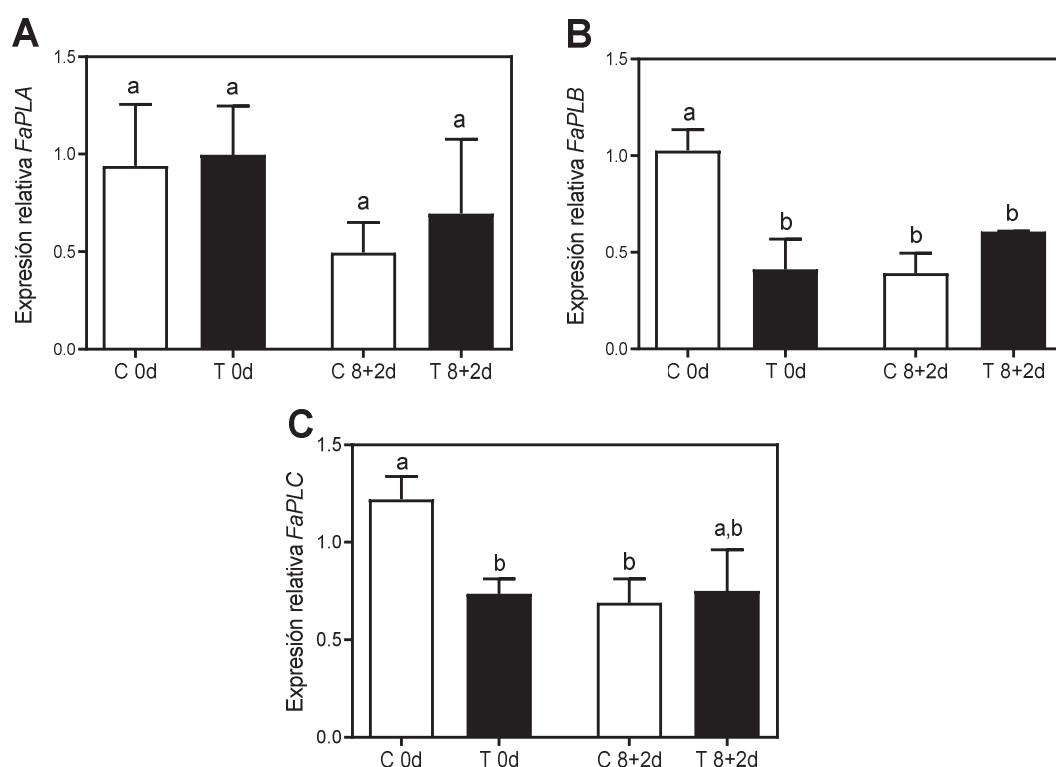


Figura 11. Patrón de expresión de genes codificantes de pectato liasas putativas, *FaPLA* (A), *FaPLB* (B) y *FaPLC* (C) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1* utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.2.4. Actividades β -Gal y α -Ara totales y expresión relativa *Fa β Gal* y *FaAra*

En cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre el metabolismo de cadenas laterales de pectinas y hemicelulosas, se investigó también las actividades β -galactosidasa y α -arabinofuranosidasa, involucradas en la degradación de galactanos y arabinanos de la pared celular vegetal, así como las expresiones relativas de genes que codifican para proteínas vinculadas a las actividades mencionadas.

Se detectó una reducción significativa de la actividad β -Gal total después de la aplicación del tratamiento térmico (0d) respecto a los controles (**Figura 12.A**). Luego del almacenamiento (8+2d), la actividad β -Gal disminuyó en frutos controles y alcanzó un nivel similar al hallado en frutos tratados térmicamente (**Figura 12.A**). Inmediatamente después del tratamiento (0d), no se observaron diferencias significativas en las expresiones relativas *Fa β Gal1*, *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3*, entre frutos tratados y controles (**Figuras 12.B, 12.C y 12.D**, respectivamente). A 8+2d, la expresión *Fa β Gal1* disminuyó significativamente tanto en frutos tratados como controles, aunque sin diferencias entre ambos grupos de frutos (**Figura 12.B**). Respecto a *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3* no se observaron diferencias en las expresiones en frutos tratados respecto a los controles a 8+2d (**Figuras 12.C y 12.D**, respectivamente). Por otra parte, se destaca que el tratamiento térmico disminuyó significativamente la expresión *Fa β Gal4* a 0d respecto a los frutos no tratados, mientras que a 8+2d la expresión aumentó y no se observaron diferencias entre ambos grupos de frutos (**Figura 12.E**).

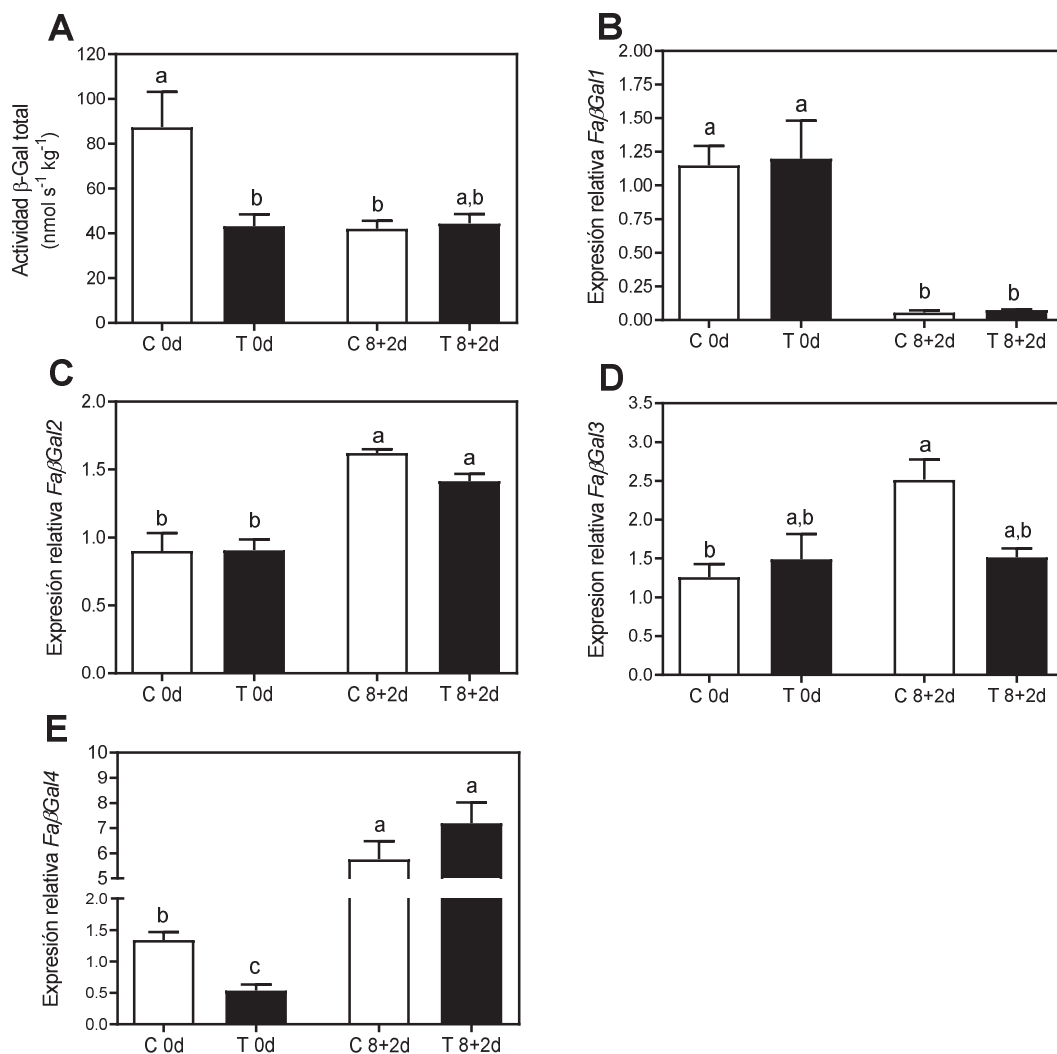


Figura 12 Actividad β -Gal (A) y patrón de expresión de los genes *FaβGal1* (B), *FaβGal2* (C), *FaβGal3* (D) y *FaβGal4* (E) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B, C, D y E. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Respecto a la actividad α -Ara total, se observó una reducción significativa en los frutos tratados térmicamente respecto a los controles, a 0d (**Figura 13.A**). Luego del almacenamiento refrigerado + estantería, no se observaron diferencias entre tratados y controles (**Figura 13.A**). En concordancia a lo observado para la actividad enzimática a 0d, la expresión *FaAra1* fue significativamente menor en frutos tratados térmicamente respecto a los controles (**Figura 13.B**). Al final del almacenamiento, no se hallaron diferencias con los frutos tratados (**Figura 13.B**).

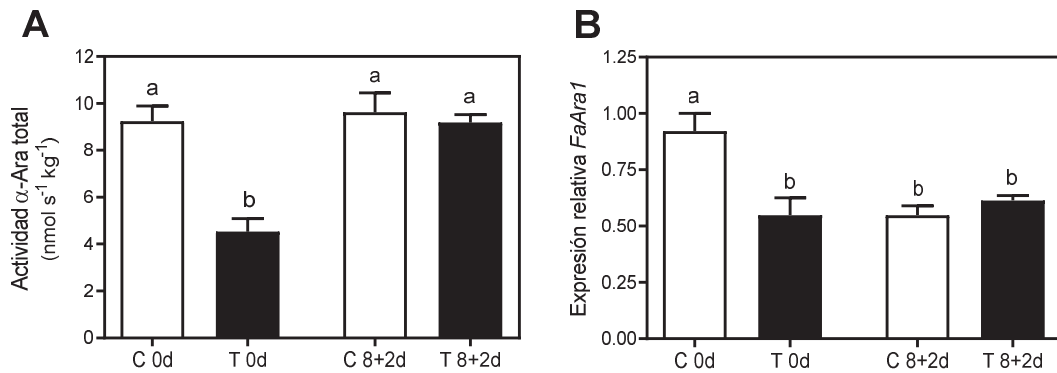


Figura 13. Actividad α -Ara total (A) y expresión relativa de *FaAra1* (B) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa *FaXyl*, *FaXTH*, *FaExp* y *FaXyn*

Considerando el metabolismo de hemicelulosas, se estudió el efecto del tratamiento térmico en la actividad β -xilosidasa total y en la expresión de un conjunto de genes relevantes para el metabolismo de estos polímeros en frutilla.

Se detectó una reducción en la actividad β -Xil total en frutos tratados térmicamente respecto a frutos controles, tanto inmediatamente después del tratamiento (0d) como luego del almacenamiento (8+2d) (**Figura 14.A**). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión *FaXyl1* entre tratados y controles en ninguno de los dos tiempos evaluados (**Figura 14.B**).

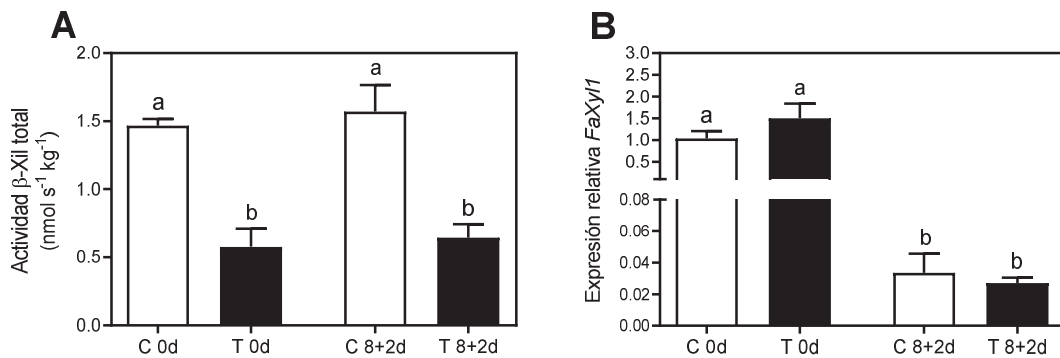


Figura 14. Actividad β -Xil total (A) y expresión relativa de *FaXyl1* (B) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Respecto al efecto del tratamiento térmico en las expresiones relativas de los genes *FaXTH1* y *FaXTH2*, se observó un incremento significativo en comparación con los controles inmediatamente después del tratamiento para *FaXTH1* (Figura 15.A), mientras que la expresión del gen *FaXTH2* fue regulada negativamente luego del almacenamiento (Figura 15.B).

No se observaron diferencias estadísticas entre frutos controles y tratados térmicamente en ninguno de los dos tiempos estudiados para la expresión relativa de *FaExp2* (Figura 15.C), mientras que el tratamiento térmico aumentó significativamente la expresión de *FaExp5* a 0d comparado con controles (Figura 15.D).

Finalmente, se observó una regulación positiva de la expresión *FaXynA* en frutos tratados inmediatamente después del tratamiento (Figura 15.E), y la expresión *FaXynC* fue significativamente menor a los controles luego del almacenamiento refrigerado + estantería (Figura 15.F).

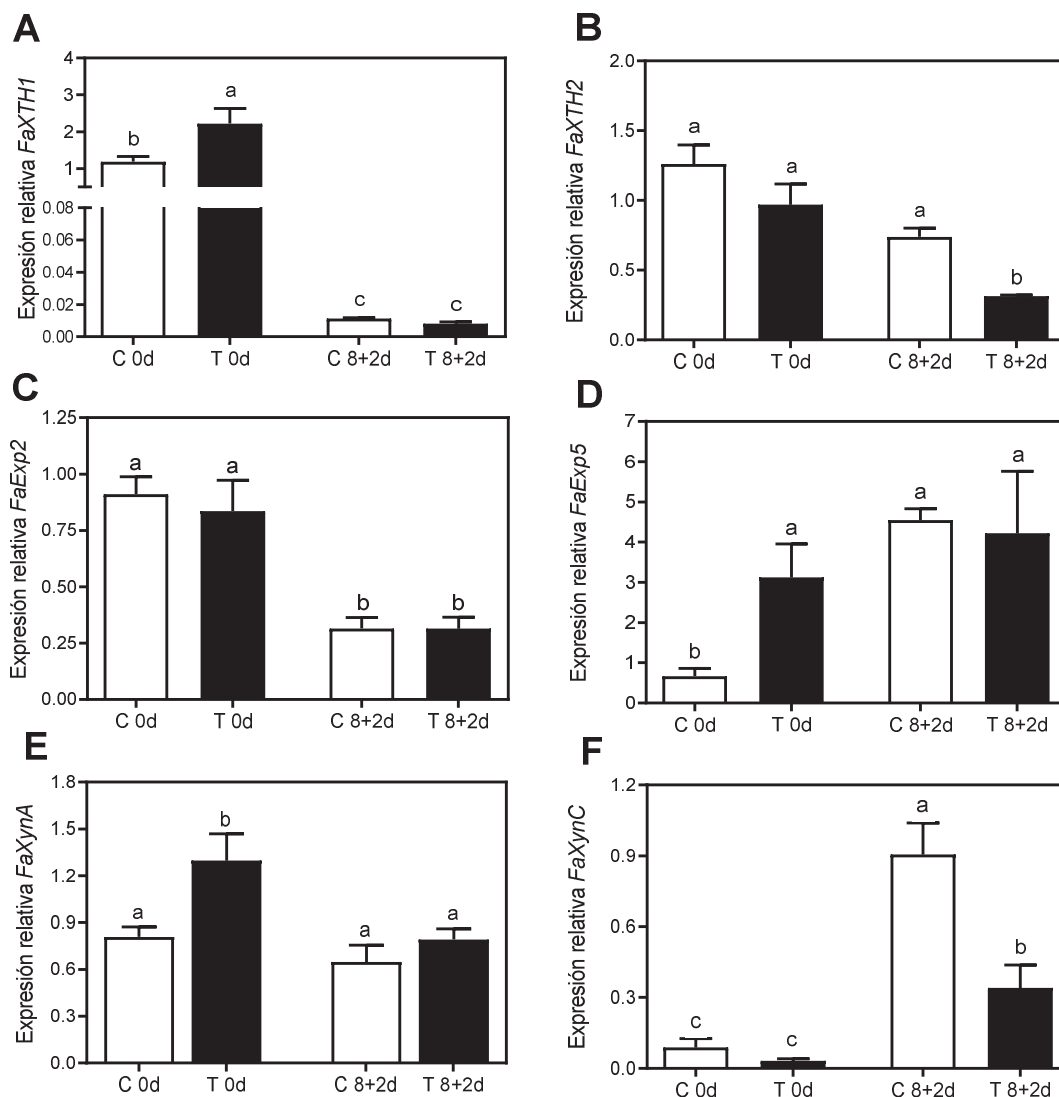


Figura 15. Expresión relativa de *FaXTH1* (A), *FaXTH2* (B), *FaExp2* (C), *FaExp5* (D), *FaXynA* (E) y *FaXynC* (F) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.3. Efecto del tratamiento térmico en respuestas de defensa de frutilla

5.3.3.1. Actividad PAL total y expresión relativa *FaPAL* y *FaCHS*

Se evaluó la actividad fenilalanina amonio liasa en frutos controles y tratados térmicamente y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, inmediatamente después del tratamiento (0d) (**Figura 16.A**). Después del almacenamiento (8+2d), la actividad

PAL fue menor respecto a los controles, correspondiéndose con el menor contenido de antocianinas observado en el grupo de tratados, a 8+2d (**Figura 4.B**). No obstante, la expresión relativa del gen *FaPAL1* se incrementó en frutos tratados, respecto a los frutos controles, tanto a 0d como a 8+2d (**Figura 16.B**). Asimismo, se observó una regulación positiva del gen *FaCHS2* en los frutos tratados al final del almacenamiento (**Figura 16.C**).

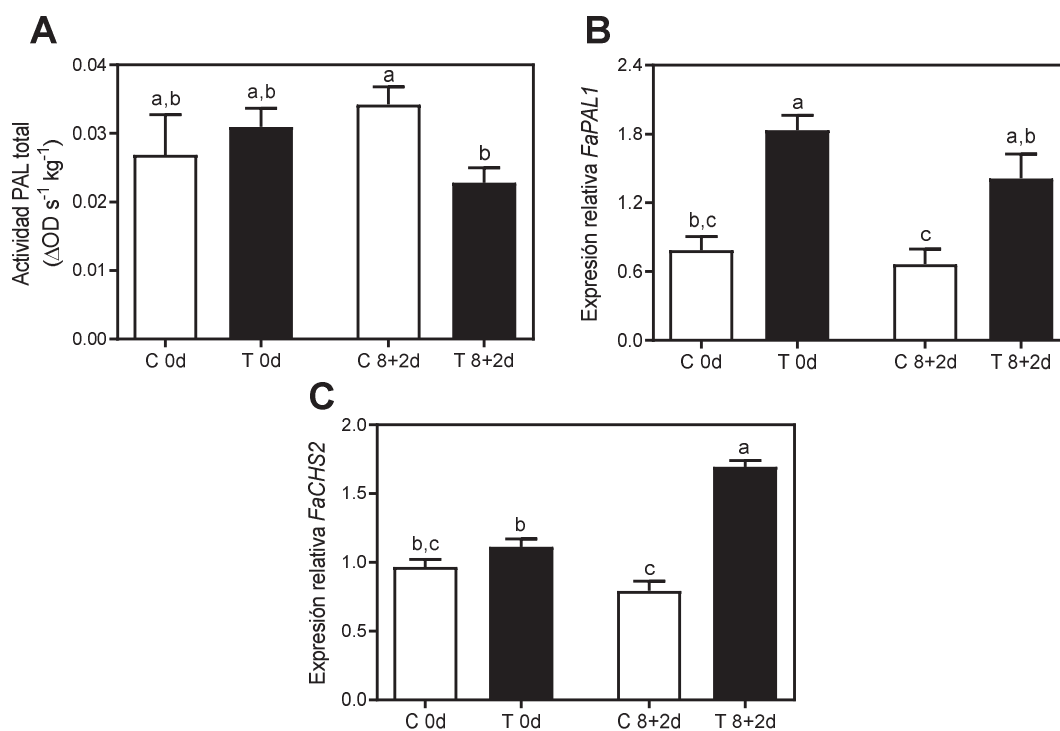


Figura 16. Actividad PAL total (A), y expresiones relativas de *FaPAL1* (B) y *FaCHS2* (C) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B y C. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.3.2. Actividades PPO y POD totales

El tratamiento térmico incrementó significativamente las actividades peroxidasa y polifenol oxidasa totales a 0d (**Figuras 17.A** y **17.B**, respectivamente). Después del almacenamiento (8+2d), la actividad POD disminuyó tanto para controles como para tratados y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 17.A**). En el caso de la actividad PPO, la misma no cambió respecto a las condiciones iniciales (0d) para ninguno de los dos grupos de frutos y se observaron mantuvieron las diferencias entre éstos (**Figura 17.B**).

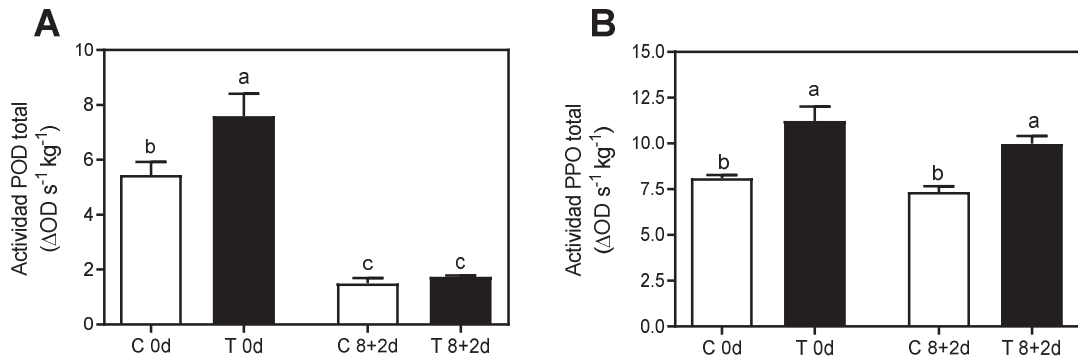


Figura 17. Actividades POD total (A) y PPO total (B) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.3.3. Actividad quitinasa total y expresión relativa *FaChi*

El tratamiento térmico incrementó la actividad quitinasa total al inicio del almacenamiento (0d) (**Figura 18.A**), correspondiéndose con la mayor acumulación de transcritos *FaChi2-2* y *FaChi3* observada en el grupo de tratados respecto a controles, a 0d (**Figura 18.B** y **18.C**, respectivamente). A 8+2d no se detectaron diferencias significativas en la actividad total, ni en la expresión *FaChi2-2* y *FaChi3* entre frutos tratados y controles.

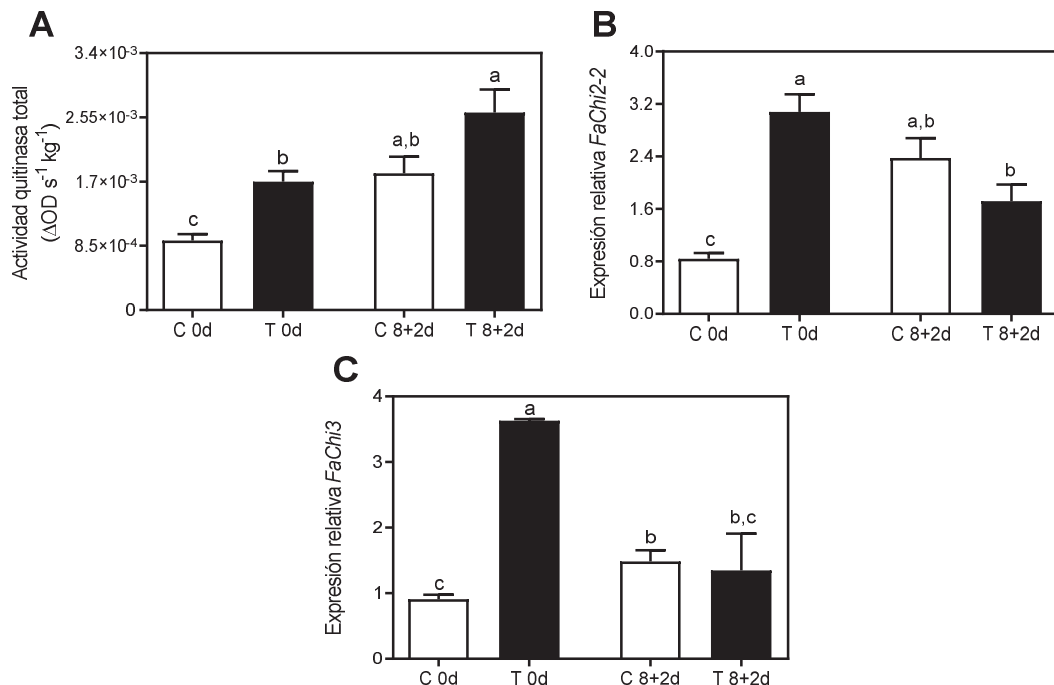


Figura 18. Actividad quitinasa total (A), y expresiones relativas de *FaChi2-2* (B) y *FaChi3* (C) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo

normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en **A** y cinco réplicas en **B** y **C**. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.3.4. Actividad β -1,3-glucanasa total y expresión relativa *Fa β G2,3*

Inmediatamente después del tratamiento térmico (0d), la actividad β -1,3-glucanasa aumentó respecto a los controles (**Figura 19.A**). Asimismo, se observó un incremento de la expresión de *Fa β G2,3* en frutos tratados térmicamente a 0d (**Figura 19.B**), mientras que a 8+2d, la expresión génica aumentó para ambos grupos de frutos y fue menor en frutillas tratadas respecto a controles (**Figura 19.B**).

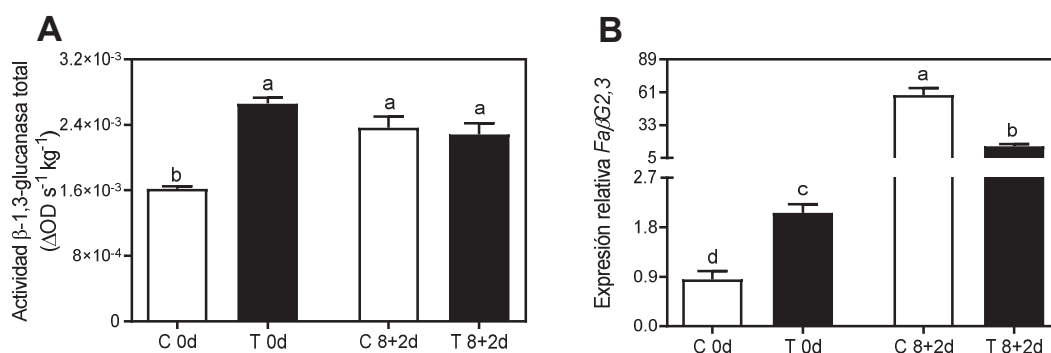


Figura 19. Actividad β -1,3-glucanasa total (**A**) y expresión relativa de *Fa β G2,3* (**B**) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en **A** y cinco réplicas en **B**. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.3.3.5. Expresión relativa *FaPR* y *FaPGIP*

El tratamiento térmico reguló positivamente la expresión relativa de *FaPR5* mientras que no modificó la correspondiente a *FaPGIP*, a 0d (**Figuras 20.A** y **20.B**, respectivamente). A 8+2d, las expresiones *FaPR5* y *FaPGIP* aumentaron tanto para controles como para tratados térmicamente, si bien se observó un menor incremento en los frutos tratados.

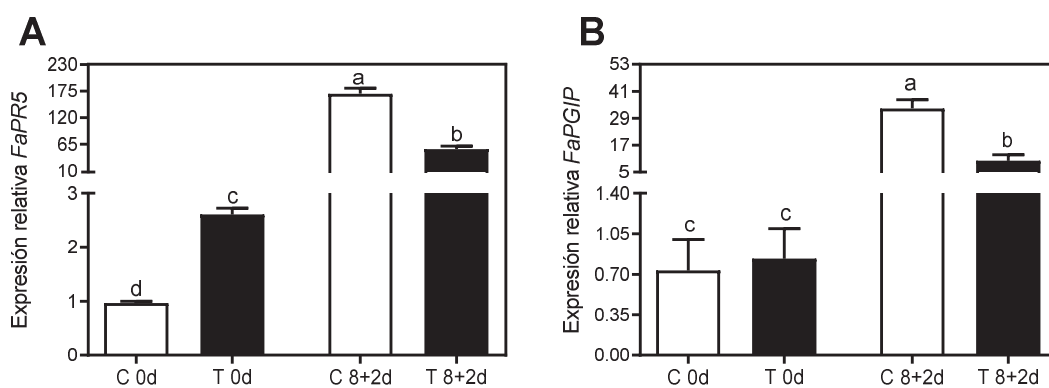


Figura 20. Expresiones relativas *FaPR5* (A) y *FaPGIP* (B) en frutos control (C) y tratados térmicamente (T), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

5.4. Discusión

En la sección 5.2 se detalló que previo al presente trabajo de Tesis doctoral se evaluó el efecto del tratamiento térmico en diversos parámetros de calidad postcosecha de frutilla, entre los que se destacan las medidas de firmeza y el contenido de antocianinas. Como resultado, se observó que los frutos tratados térmicamente mantuvieron los niveles de firmeza iniciales luego del almacenamiento, y que el tratamiento térmico provocó una acumulación menor de antocianinas respecto a los frutos controles. De esta manera, se probó la efectividad del estrés térmico para retrasar la maduración postcosecha de los frutos de frutilla del cultivar Aroma. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por Vicente y col. (2002) para el cultivar Selva.

Asimismo, como se mencionó en la Introducción general (sección 2.1.3.3.), los ácidos orgánicos junto con los azúcares, son componentes claves del sabor de frutilla, y la relación ácidos/azúcares es usada frecuentemente como índice de calidad del fruto (Manning, 1993). De esta manera, para continuar con el análisis del efecto del tratamiento térmico en parámetros de calidad de frutilla, durante el trabajo doctoral se realizaron medidas de azúcares totales y no se observaron diferencias entre frutos tratados y controles en ningún tiempo evaluado. El fruto de frutilla no acumula cantidades apreciables de azúcares después de la cosecha, y la degradación de almidón aporta solamente el 3% de los azúcares totales en el fruto maduro (Souleyre y col., 2004). En este sentido, no se esperarían diferencias (o posiblemente sólo un leve incremento)

en el contenido de azúcares totales durante el almacenamiento de los frutos controles, lo cual se observó en el presente trabajo. En cuanto al efecto del tratamiento térmico en la acumulación de azúcares totales durante el almacenamiento postcosecha, es posible que sea cultivar-dependiente, dado que se reportó que el tratamiento térmico (aire a 45 °C + almacenamiento de 10 d a 3 °C) incrementó el contenido de azúcares en el cultivar Pájaro (Lara y col., 2006), mientras que no se observaron diferencias entre frutos controles y tratados en el cultivar Selva (Vicente y col., 2002), ni en la presente Tesis doctoral para el cultivar Aroma.

Respecto al estudio del efecto del tratamiento térmico en el contenido de compuestos fenólicos, no se detectaron cambios durante el almacenamiento de frutos controles, pero notablemente, el tratamiento térmico incrementó significativamente el contenido de estas moléculas antes y después del almacenamiento. En este sentido, se informó un reforzamiento de las paredes celulares en células de raíces de tomate a través de la producción de compuestos fenólicos inducido por elicitores (Mandal y Mitra, 2007). Se reportó además un incremento en el contenido total de compuestos fenólicos y en la resistencia inducida contra *B. cinerea* por el tratamiento térmico en frutillas del cultivar Hongyan (Jin y col., 2016). Vinculado con los resultados obtenidos en el presente trabajo, un incremento de los compuestos fenólicos en las paredes celulares como resultado del estrés térmico podría estar relacionado con la mayor firmeza, así como por un menor desarrollo de podredumbres en los frutos tratados térmicamente.

Cuando se realizó el fraccionamiento de la pared celular de frutos tratados y controles, se observó que el tratamiento térmico modificó la cantidad de pared total, así como la de las distintas fracciones poliméricas. Los resultados más relevantes mostraron un contenido significativamente mayor de ácido galacturónico en las fracciones correspondiente a pectinas de interacciones iónicas (PSE) y covalentes (PSH), un mayor contenido de hemicelulosas y celulosa, así como un mayor contenido de azúcares neutros en frutos tratados respecto a los controles.

Durante la maduración de frutilla también se produce la pérdida de azúcares neutros de la pared celular debido principalmente a la liberación de arabinanos y galactanos que forman parte de las cadenas laterales que pueden encontrarse en las pectinas ramificadas (Rosli y col., 2009). El proceso de liberación de estos azúcares está catalizado por enzimas tales como β -galactosidasas y α -arabinofuranosidasas (Posé y col., 2011; Paniagua y col., 2016). Adicionalmente, se propuso que la proteína FaPG1 no sólo degrada cadenas principales de HGs durante la maduración de frutilla, sino que además reduce el número de cadenas laterales de PSE y PSH (Posé y col., 2015). En el presente trabajo de Tesis, el estrés térmico redujo las

actividades PG, β -Gal y α -Ara, así como disminuyó la expresión de *FaPG1* y también de dos genes relacionados con el metabolismo de cadenas laterales y del ablandamiento del fruto, *FaAra1* y *Fa β Gal4*. Conjuntamente, estos resultados podrían explicar, al menos parcialmente, el mayor contenido de azúcares neutros detectado en frutos tratados térmicamente respecto a frutos controles.

En el presente trabajo, se observó una mayor hidratación de la pared celular de frutos tratados térmicamente respecto a frutos no tratados después del almacenamiento refrigerado + estantería. En este sentido, se reportó que la hidratación de los RIAs en el fruto de kiwi alcanza un pico durante la maduración, pero decrece en el estadio sobremaduro (Redgwell y col., 1997a). Por consiguiente, y como **primer reporte** en el caso de frutilla, se decidió estudiar la hidratación *in vitro* de los RIAs a lo largo de la maduración de este fruto, y en concordancia con lo reportado en kiwi, se reveló un incremento gradual del proceso de hidratación alcanzando un pico en el estadio 100%R y luego una disminución pronunciada en el estadio sobremaduro. Es de destacar que no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon las alturas de los RIAs de frutos controles y tratados a 0d, con RIAs hidratados de frutos tratados térmicamente a 8+2d, siendo dichas alturas similares a las observadas para los RIAs aislados de frutos 80%R. En contraste, la altura de los RIAs de frutos controles a 8+2d fue similar a la detectada para frutos de frutilla sobremaduros. Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico es capaz de detener (o arrestar) el proceso de hidratación *in vitro* de las paredes celulares de frutilla. Es importante mencionar que, mientras el proceso de hidratación asociado a la maduración de los frutos estaría determinado por los factores mencionados en la Sección 2.2.4.3., en los estadios sobremaduros, la red celulosa-hemicelulosas se vería modificada por enzimas de acción específica como las xiloglucanasas y las xiloglucano endo-transglicosilasas causando el colapso de la estructura microfibrilar y reduciendo la hidratación de la pared celular (Redgwell y col., 1997b). Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran en concordancia con estas sugerencias, dado que la menor hidratación de las paredes en frutos controles a 8+2d podría deberse a la menor expresión de un gen vinculado con el refuerzo de la pared celular (*FaXTH1*) y a una mayor expresión de un gen relacionado con la hidrólisis de hemicelulosas (*FaXTH2*), junto con un menor contenido de celulosa y hemicelulosas en frutos controles respecto a los frutos tratados térmicamente.

En la Sección 5.2 de Antecedentes, se informó que el crecimiento *in vitro* del patógeno *Botrytis cinerea* es significativamente menor cuando dispone de RIAs de frutos tratados térmicamente como única fuente de nutrientes, que cuando dispone de paredes celulares de frutos no tratados. Estos resultados estarían vinculados con una menor accesibilidad de las

enzimas hidrolíticas del patógeno a la pared celular de los frutos sometidos al tratamiento térmico, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis en cuanto a la modificación del metabolismo de la pared celular por el tratamiento térmico. En este sentido, Cantu y col., (2008) evaluaron la biomasa del patógeno *B. cinerea* en cultivos líquidos conteniendo RIAs de frutos de tomate transgénicos con supresión simultánea de la expresión poligalacturonasa y expansina y lo compararon con frutos salvajes utilizando anticuerpos monoclonales. Los autores detectaron que *B. cinerea* creció significativamente menos cuando se utilizaron paredes celulares de plantas transgénicas respecto a las de frutos de plantas salvajes. De acuerdo con esto, si bien la reducción *in vitro* del crecimiento de *Botrytis* en un medio conteniendo RIAs aislados de frutos tratados térmicamente comparado con controles podría explicarse por una pared celular con una estructura y composición alteradas que reducirían la digestibilidad de la misma por parte del patógeno y/o por la presencia de inhibidores del crecimiento fúngico en las paredes celulares de los frutos tratados térmicamente, los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral tanto en el contenido de los distintos polímeros como en la actividad de enzimas y genes vinculados con el metabolismo de pectinas y hemicelulosas, sugieren que el tratamiento térmico podría estar limitando la accesibilidad de *B. cinerea* a sus sustratos habituales.

Asimismo, y como se detalla en la sección 2.2.3. del presente trabajo, el rol central de la matriz péctica en el proceso de ablandamiento de frutilla se estudió y comprobó, tanto a través de la caracterización funcional de genes usando plantas transgénicas, como desde aproximaciones bioquímicas (Jiménez-Bermúdez y col., 2002; Rosli y col., 2004; Osorio y col., 2008; Villarreal y col., 2008; Quesada y col., 2009; Paniagua y col., 2016, 2017). De esta manera, se decidió estudiar la respuesta al estrés térmico de dos actividades centrales modificadoras de pectinas en el fruto de frutilla (actividades pectin metilesterasa y poligalacturonasa, respectivamente) así como evaluar la posible correspondencia con el patrón de expresión de genes relevantes para el metabolismo de la pared celular como en la resistencia a *B. cinerea* (*FaPME1*) (Castillejo y col., 2004; Osorio y col., 2008) y en la firmeza del fruto (*FaPG1*) (Villarreal y col., 2008; Quesada y col., 2009). Se observó que el tratamiento térmico provocó un incremento significativo en la actividad endógena PME comparado con controles, tanto inmediatamente después del tratamiento como luego del almacenamiento refrigerado + estantería. Adicionalmente, se estudió el efecto del tratamiento térmico en el grado de esterificación de pectinas totales, teniendo en cuenta que este parámetro indica el porcentaje de pectinas metiladas presentes en la pared celular. En concordancia con los resultados obtenidos para la actividad PME total, se detectó un menor GE en frutos tratados térmicamente que en

controles tanto antes como después del almacenamiento. Más aún, el tratamiento térmico provocó un aumento significativo de la expresión del gen *FaPME1* respecto a los controles a 0d. Como se indicó en la Sección 2.2.5, la expresión del gen *FaPME1* es específica de la maduración del fruto de frutilla (Castillejo y col., 2004). Frutillas transgénicas que sobreexpresan este gen producen oligogalacturónidos con un grado de metil esterificación reducido en comparación con aquellos frutos de plantas salvajes y se sugirió además, que la reducción en la esterificación de las pectinas dispararía respuestas de defensa en frutilla (Osorio y col., 2008; Osorio y col., 2011).

En relación a la actividad poligalacturonasa, el tratamiento térmico disminuyó significativamente la actividad PG total tanto a 0d como a 8+2d. En conformidad con estos resultados, la expresión *FaPG1* fue significativamente menor en frutos tratados térmicamente comparados con los controles a 0d. En frutilla, la expresión del gen *FaPG1* es asociada a la maduración del fruto, así como a diferencias de firmeza entre cultivares (Quesada y col., 2009; Villarreal y col., 2008). Asimismo, se reportó que frutos de frutilla con el gen *FaPG1* silenciado mostraron modificaciones notables en la nanoestructura de las pectinas, lo que se correlaciona con una reducción significativa del ablandamiento del fruto (Posé y col., 2015). Cabe destacar que la incompatibilidad entre las actividades enzimáticas y niveles de expresión *FaPME1* y *FaPG1* detectadas al final del almacenamiento (8+2d), podría deberse a la contribución de otros genes que codifican para PMEs y PGs. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el efecto del tratamiento térmico en la marcada regulación positiva de *FaPME1* inmediatamente después del mismo, estaría contribuyendo a mantener la estructura péctica durante el almacenamiento, así como a generar homogalacturonanos con un menor grado de esterificación que serían capaces de unir Ca^{2+} y enlazarse uno al otro, reforzando la matriz de pectinas. Conjuntamente, este proceso estaría beneficiado por la disminución de la actividad PG y de la expresión *FaPG1*. Es de destacar que estos resultados concuerdan con el mayor contenido de PSE observado en frutos tratados térmicamente respecto a frutos no tratados.

Además, se estudió el efecto del tratamiento térmico en el patrón de expresión de tres genes de pectato liasas putativas relacionados con la maduración de frutilla (*FaPLA*, *FaPLB*, *FaPLC*) (Benítez-Burraco y col., 2003). Si bien el tratamiento térmico no modificó los niveles de expresión de *FaPLA* respecto a los controles en ninguno de los tiempos evaluados, disminuyó significativamente la expresión de *FaPLB* y *FaPLC* a 0d. El efecto del tratamiento térmico sobre la expresión del gen *FaPLC* fue particularmente interesante dado a que como se mencionó en la sección 2.2.3., el mismo se caracterizó funcionalmente a través del uso de

plantas de frutilla transgénicas y se observó un retraso significativo del ablandamiento de los frutos respecto a las frutillas de plantas salvajes (Jiménez-Bermúdez y col., 2002).

Debido a que las actividades β -galactosidasa y α -arabinofuranosidasa están involucradas con la degradación de galactanos y arabinanos (Redgwell et al., 1997b), en el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento térmico en dichas actividades enzimáticas y en los genes asociados. Como resultado, se observó una disminución significativa en la actividad β -Gal en frutos tratados respecto a los controles a 0d. Respecto a los genes asociados a la actividad β -Gal, en frutilla se reportó la caracterización de cuatro genes (*Fa β Gal1*, *Fa β Gal2*, *Fa β Gal3* y *Fa β Gal4*) que codifican para β -galactosidasas (Trainotti y col., 2001; Paniagua y col., 2016). Se reportó que *Fa β Gal1* muestra un patrón de expresión relacionado con la maduración del fruto, mientras que *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3* se expresan principalmente en frutos verdes (Trainotti y col., 2001). Respecto a *Fa β Gal4* se informó que su regulación antisentido en plantas de frutilla aumenta los niveles de galactosa de las paredes celulares y reduce el ablandamiento de los frutos transgénicos (Paniagua y col., 2016). En el presente trabajo, se evaluó el efecto del tratamiento térmico sobre la expresión de esta familia de genes. No se detectaron diferencias en el nivel de expresión de *Fa β Gal1* entre grupos tratados y controles, tanto inmediatamente después del tratamiento como luego del almacenamiento. No obstante, la expresión *Fa β Gal1* decreció significativamente después del almacenamiento (8+2d), tanto para controles como para frutos tratados contribuyendo, al menos en parte, a la reducción de la actividad β -Gal total observada luego del almacenamiento. El tratamiento térmico tampoco generó cambios inmediatos en los niveles de expresión de *Fa β Gal2* y *Fa β Gal3* respecto a frutos controles. Sin embargo, es de destacar que el tratamiento térmico disminuyó significativa y marcadamente la expresión *Fa β Gal4* respecto al grupo control de manera temprana (0d). Este resultado explicaría al menos en parte, la reducción en la actividad β -Gal total inmediatamente después del tratamiento térmico.

Respecto a la actividad α -Ara, se detectó una disminución significativa a 0d en los frutos tratados térmicamente comparado con los controles. Interesantemente, la expresión del gen *FaAra1*, la cual está asociada con la maduración de frutilla (Rosli y col., 2009), se redujo significativamente a 0d en frutos tratados térmicamente respecto a los controles.

En el presente trabajo de Tesis se evaluó el efecto del tratamiento térmico en la actividad β -xilosidasa así como en un grupo de genes relevantes para el metabolismo de hemicelulosas de frutilla. En estudios realizados por Bustamante y col. (2006), se reportó una mayor actividad, así como una acumulación mayor y más temprana del transcripto *FaXyl1* y de la proteína correspondiente durante la maduración de frutos de un cultivar de frutilla más blando respecto

a un cultivar más firme, sugiriendo la importancia de la enzima FaXyl1 y su gen codificante en el ablandamiento del fruto. En el presente trabajo, no se detectaron diferencias en la expresión *FaXyl1* entre frutillas controles y tratadas térmicamente. Sin embargo, se observó una actividad β -Xil total menor en frutos tratados tanto inmediatamente después del tratamiento como luego del almacenamiento refrigerado + estantería. En este sentido, en frutillas del cultivar Selva, la actividad xilosidasa total decreció inmediatamente después del tratamiento térmico y durante el almacenamiento a 20 °C (Vicente y col., 2005). Además, en frutos del cultivar Selva cosechados en estadio blanco, se reportó que la actividad β -xilosidasa fue un 30% más baja a la hallada en frutos control inmediatamente después del tratamiento (Martínez y Civello, 2008).

Como se indicó en la Sección 2.2.3 de la Introducción, las enzimas xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTH) pueden presentar una o dos actividades catalíticas diferentes de acuerdo a su efecto en el metabolismo de los xiloglucanos. Mientras que la actividad xiloglucano endo-hidrolasa (XEH) produce la reducción irreversible de cadenas hemicelulósicas, la actividad xiloglucano endo-transglicosilasa (XET) involucra la ruptura no hidrolítica y la ligación de cadenas de xiloglucano (Eklöf y Brumer, 2010). Respecto a la interacción hemicelulosa-celulosa en la pared celular, se propuso que la misma es principalmente modulada por dos grupos de proteínas, las expansinas y las xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTH) (Sampedro y Cosgrove, 2005; Eklöf y Brumer, 2010). En este sentido, se observó que el tratamiento térmico provocó un aumento en la expresión *FaXTH1* (la cual tendría una actividad transglicosilasa) y una disminución *FaXTH2* (gen que codificaría una enzima putativa con actividades tanto XET como XEH), sugiriendo un efecto de refuerzo de la fracción polimérica constituida por xiloglucanos.

Por otra parte, es de destacar que diversos autores discutieron el vínculo entre la modificación en la expresión de XTHs, expansinas y PMEs en respuesta al estrés térmico y la adquisición de termotolerancia en diversas especies vegetales. En repollo chino (*Brassica rapa* L.), genes codificantes para proteínas de la familia XTHs, expansinas y pectin esterases fueron regulados positivamente por el tratamiento térmico (Yang y col., 2006). Los autores propusieron que el aumento en la expresión *XTH*, debido a la aplicación de un tratamiento a temperatura alta pero permisiva (37 °C) correspondió a la adquisición de termotolerancia, la cual podría estar involucrada con el reforzamiento de la pared celular. Un estudio desarrollado en el fruto de la vid, reveló un incremento de la acumulación de ARNm de XETs por el tratamiento térmico (Rienth y col., 2014), y se reportó un aumento en la expresión de genes *XTH* en plantas de *Agrostis* en respuesta a una temperatura de 40 °C (Xu y col., 2008). Se

sugirió también que las PME_s están involucradas en la remodelación de la pared celular vegetal en respuesta al estrés térmico (Wu y col., 2018).

En frutilla, Dotto y col., (2011) reportaron que el tratamiento térmico en frutos del cultivar Camarosa reguló negativamente la expresión de tres genes de expansinas (*FaExp1*, *FaExp2* y *FaExp6*), tanto a 0 h como después de 48 h de almacenamiento en estantería. Sin embargo, y de forma similar a lo observado en el presente trabajo, los autores informaron que la expresión del gen específico de fruto, *FaExp5*, aumentó por el tratamiento térmico. Además, en la presente Tesis se encontró que el tratamiento térmico aumentó significativamente la expresión del gen *FaXynA* a 0d respecto a los controles.

De esta manera y tomados en conjunto, los estudios reportados sugieren que con el fin de tolerar temperaturas altas y ser capaces de mantener las funciones celulares durante el estrés térmico, las paredes celulares de las plantas requieren ser más elásticas. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la regulación positiva de *FaPME1*, *FaXTH1*, *FaExp5* y *FaXynA*, en frutos tratados térmicamente comparado con controles, podrían estar relacionado a las evidencias mencionadas.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la Tesis doctoral revelaron que el tratamiento térmico es capaz de inducir respuestas de defensa en frutilla. La actividad PAL fue menor en frutos estresados térmicamente, lo cual se vinculó con el menor contenido de antocianinas al final del almacenamiento. Sin embargo, se detectó una mayor expresión *FaPAL1* en los frutos tratados. Respecto al efecto de tratamientos térmicos sobre la actividad PAL, es interesante destacar que se reportó una relación en la inducción de dicha actividad enzimática por estos tratamientos y una mayor tolerancia al daño por frío en frutos de mandarina (Sanchez-Ballesta y col., 2000) y de banana (Chen y col., 2008). Asimismo, en frutos de uva sometidos a estrés térmico mediante el sumergimiento en un buffer a 40 °C durante 8 h encontraron un aumento en la actividad PAL 1 h después del tratamiento, así como mayor acumulación de un mensajero que codifica una PAL putativa (Wen y col., 2007). De esta manera, y teniendo en cuenta que en frutilla la actividad PAL no se correlacionó con el patrón de expresión *FaPAL1*, es posible que la mayor acumulación del transcripto *FaPAL1* en frutos tratados se deba a que dicho gen responde a situaciones de estrés y pueda estar vinculado con mecanismos de defensa del fruto, lo cual se correlacionaría con el incremento de compuestos fenólicos que se observó en el grupo de frutos tratados. En este sentido, en el cultivar Hongyan, se reportó un aumento de la expresión *FaPAL6* en frutos tratados térmicamente comparado con los controles (Jin y col, 2016). Respecto a la menor acumulación de antocianinas, observada en frutos tratados al final del almacenamiento (Antecedentes, sección 5.2.1), es posible que uno o

más genes pertenecientes a la familia *FaPAL* (*FaPAL2-FaPAL5*) respondan disminuyendo su expresión luego de los tratamientos térmicos lo cual redunde en una acumulación menor de antocianinas luego de 8 días a 4 °C + 2 días a 20 °C.

Debido al papel de las chalcona sintetasas como enzimas claves en la vía de síntesis de los flavonoides, se decidió evaluar la expresión relativa del gen *FaCHS2* en frutos tratados térmicamente y controles. Se observó un incremento de la expresión de *FaCHS2* en frutos tratados al final del almacenamiento refrigerado + estantería. De esta manera, es posible que el gen *FaCHS2*, se encuentre vinculado con respuestas del fruto frente a estímulos abióticos, de forma similar a lo detectado para el gen *FaPAL1*.

Respecto a la respuesta de frutillas al estrés por calor, se reportó que frutos tratados térmicamente (45 °C, 3 h) y almacenados 7 días a 0 °C y 2 días a 20 °C, incrementaron su capacidad antioxidante, lo cual fue congruente con una regulación positiva de actividades enzimáticas tales como ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) (Vicente y col., 2006). Asimismo, frutillas del cultivar Hongyan, tratadas con aire caliente a 45 °C por 3,5 h presentaron un aumento en las actividades APX, SOD y catalasa (Jin y col., 2016). En el presente trabajo, se observó que el tratamiento térmico aumentó significativamente no solo la actividad peroxidasa y sino también la actividad polifenol oxidasa.

Como se mencionó en la sección 2.3, las quitinasas y las β -1,3-glucanasas al igual que otras proteínas PR, desempeñan un papel en la resistencia vegetal contra distintos patógenos (Kasprzewska, 2003; Balasubramanian y col., 2012). En frutilla, genes de quitinasas y β -1,3-glucanasas fueron reguladas por condiciones de estrés, tanto biótico y abiótico (Shi y col., 2006; Guidarelli y col., 2011; Pombo y col., 2011a). Respecto al estrés térmico, Widiastuti y col. (2013), reportaron que plántulas de frutilla tratadas a 50 °C durante 20 s redujeron el índice de enfermedad y la podredumbre de la corona causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Las plántulas sometidas al choque térmico, presentaron un marcado aumento de la expresión *FaChi2-1*, respecto a las no tratadas. El tratamiento a 45 °C por 3,5 h indujo las actividades quitinasa y β -1,3-glucanasas en los frutos de frutilla del cultivar Hongyan (Jin y col., 2016).

En el presente trabajo se **reporta por primera vez** una correlación entre el aumento de las actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa en los frutos tratados, y la acumulación de los transcriptos *FaChi2-2* y *FaChi3*, y *Fa β G2,3*, respectivamente. Asimismo, se informa el aumento en la expresión del gen *FaPR5* en frutos tratados térmicamente inmediatamente después del tratamiento.

Como consideración final de este Capítulo, vale la pena mencionar que el tratamiento térmico podría estar actuando de forma directa en la activación de genes y enzimas de defensa,

pero también los frutos sometidos al estrés térmico podrían estar respondiendo a elicitores generados por el incremento en la actividad PME endógena. En este sentido, es importante mencionar que la sobreexpresión del gen *FaPME1* en la frutilla diploide *Fragaria vesca* genera oligo galacturónidos (OGAs) parcialmente demetilados, los cuales poseen capacidad elicitora (Osorio y col., 2008). Además, y a través de estudios transcriptómicos y metabolómicos, se mostró que la generación de estos OGAs parcialmente demetilados reforzarían el sistema de defensa de las plantas de frutilla y jugarían un rol activo en el desarrollo del fruto (Osorio y col., 2011). En este sentido, y en relación a los resultados obtenidos en el presente Trabajo respecto a la expresión *FaPR5*, es interesante mencionar que Osorio y col. (2011) observaron una regulación positiva de este gen cuando inyectaron 500 µg de OGAs provenientes de plantas sobre-expresantes del gen *FaPME1* en frutos maduros de *F. x ananassa* y *F. vesca*, respecto a frutos inyectados con OGAs provenientes de plantas del tipo salvaje. De esta forma, es posible sugerir que la marcada regulación positiva de la actividad PME total, así como la expresión *FaPME1* por el tratamiento térmico, podría contribuir a la activación de las respuestas de defensa observadas en los frutos tratados, así como a restringir la invasión de patógenos fúngicos preservando la calidad de los frutos.

5.5. Conclusiones

Tomando en cuenta los resultados obtenidos a través de las diferentes aproximaciones realizadas en el presente trabajo, se sugiere que el efecto del tratamiento térmico en la preservación de la calidad del fruto de frutilla durante la postcosecha, está estrechamente relacionado con la regulación positiva de los genes involucrados en el refuerzo de la pared celular (como *FaPME1* y *FaXTH1*), y la regulación negativa de genes relevantes para el desensamblaje de la pared celular (*FaPG1*, *FaPLB*, *FaPLC*, *FaAra1* y *FaβGal4*). Los resultados de las hidrataciones *in vitro* de la pared celular y el crecimiento de *Botrytis cinerea* en placa, así como las modificaciones en el contenido y composición de la pared celular, sugieren que el tratamiento térmico modifica la estructura de la misma.

Asimismo, el tratamiento térmico es capaz de activar la actividad de enzimas y la expresión de genes clásicamente asociados con respuestas del fruto.

De esta manera, el estrés térmico controlado se revela a sí mismo no sólo como un tratamiento postcosecha que preserva las principales propiedades organolépticas de frutilla, sino también como una herramienta que podría contribuir al entendimiento de los mecanismos subyacentes a la respuesta de la pared celular de este fruto de textura delicada a estímulos abióticos.

6. CAPÍTULO II: TRATAMIENTO CON CaCl₂

6.1. Introducción

La utilización de tratamientos con CaCl₂ como un acercamiento más amigable con el medio ambiente para retrasar el ablandamiento y controlar el desarrollo de enfermedades postcosecha se informó para distintos frutos carnosos (Akhtar y col., 2010; Irfan y col., 2013; Youryon y Wongs-Aree, 2015; Belge y col., 2017; Akter y col., 2020; Lv y col., 2020; Fu y col., 2021; Ghasemi y col., 2021).

En frutilla, se reportó el uso de tratamientos con CaCl₂ para mantener la calidad de los frutos. Lara y col., (2004) informaron que la inmersión de frutillas en una solución de CaCl₂ 1% p/v mejoró la resistencia a *Botrytis cinerea*, dio lugar a frutos con un mayor contenido de pectinas unidas por interacciones iónicas y contribuyó a preservar la integridad estructural de la pared celular y la lámina media. Hernández-Muñoz y col., (2006) mostraron que sumergir los frutos en una solución 1% p/v de gluconato de calcio fue efectivo en disminuir el daño superficial causado por *B. cinerea* y en retrasar el decaimiento por acción fúngica y la pérdida de firmeza. En un trabajo muy interesante, Zhang y col., (2018) demostraron que la inmersión de frutillas en una solución 2% p/v de CaCl₂, inhibió efectivamente la degradación postcosecha de las pectinas de interacciones iónicas, lo cual se evidenció en un mayor entrecruzamiento de estos polímeros por acción del ion calcio. A través de ensayos de Espectroscopía de Fuerza Atómica (EFA), los autores mostraron que después de 13 y 17 días de almacenamiento refrigerado, los frutos tratados con calcio fueron más firmes y mostraron un mayor porcentaje de pectinas de interacciones iónicas más largas y anchas que los frutos control.

Sin embargo, a pesar de estas valiosas contribuciones, el conocimiento de las bases moleculares y bioquímicas detrás de los efectos del tratamiento con calcio en la preservación de la pared celular y la resistencia a la infección fúngica en frutilla es escaso.

De esta manera, el presente Capítulo propone el estudio de la influencia del tratamiento con CaCl₂ en el patrón de expresión de genes y en la actividad de enzimas íntimamente vinculados con el metabolismo de la pared celular y la firmeza de frutilla. Se explora, además, el efecto del tratamiento con CaCl₂ en las respuestas de defensa de del fruto.

6.2. Antecedentes

6.2.1. Firmeza y antocianinas

En contraste con los frutos controles, cuya firmeza disminuyó después del almacenamiento, los frutos tratados con CaCl_2 mantuvieron el nivel de firmeza y fueron alrededor de un 15% más firmes que los controles después de 8 días a 4 °C + 2 días a 20 °C (8 + 2d) (**Figura 21.A**).

Cuando se midió el contenido de antocianinas, hubo un aumento natural en la cantidad de estos pigmentos durante la maduración postcosecha, pero no se observaron diferencias significativas entre frutos controles y tratados en ninguno de los dos tiempos evaluados (**Figura 21.B**). Asimismo, se midieron parámetros tales como contenido de azúcares totales, pH y acidez titulable, y no se encontraron diferencias significativas entre frutos controles y tratados a 0d ni a 8+2d (datos no mostrados).

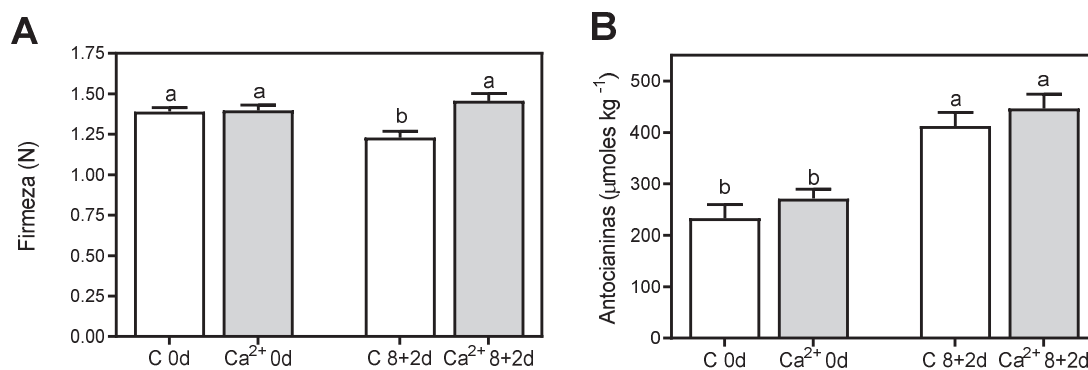


Figura 21. Nivel de firmeza (**A**) y contenido de antocianinas (**B**) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.2.2. Crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*

Se evaluó el crecimiento de *B. cinerea* en placas de Petri conteniendo RIAs aislados de frutos sumergidos en la solución de CaCl_2 y de frutos controles a 8+2d, como única fuente de nutrientes. Como resultado, el crecimiento radial de *B. cinerea* en placas conteniendo RIAs de frutos tratados (Ca^{2+} 8+2d) fue significativamente menor que para frutos controles (C 8+2d) en cualquiera de los tiempos analizados (24, 72 y 120 h post-inoculación, hpi) (**Figura 22**).

Con el fin de descartar un posible efecto inhibitorio del CaCl_2 *per se*, se incluyeron placas conteniendo 1% p/v de CaCl_2 + RIAs de frutos tratados (Ca^{2+} 8+2d + CaCl_2). Al término de los tiempos evaluados, se observó una mayor velocidad de crecimiento de *B. cinerea* (que alcanzó el límite de las placas a 72 hpi) en placas Ca^{2+} 8+2d + CaCl_2 cuando se compararon con aquellas conteniendo RIAs de frutos controles y frutos tratados con CaCl_2 (**Figura 22**).

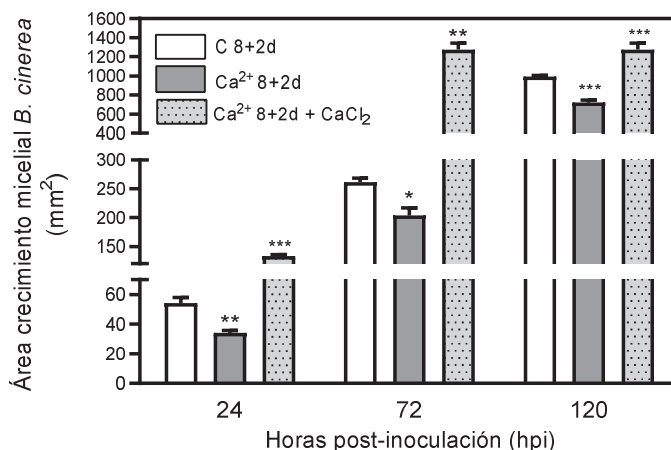


Figura 22. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas conteniendo agar 0,8% p/v homogeneizado con 0,2 mg ml⁻¹ de paredes celulares RIAs como única fuente de carbono, de frutos controles (C), tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}) y RIAs de frutos tratados + CaCl_2 1% p/v (Ca^{2+} 8+2d + CaCl_2), a 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Dunnett como post-test. Asteriscos indican diferencias significativas entre tratados y controles (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

6.3. Resultados

6.3.1. Parámetros de calidad del fruto

6.3.1.1. Compuestos fenólicos

Luego del tratamiento (0d), el contenido de compuestos fenólicos fue ligeramente mayor en los frutos sumergidos en la solución de CaCl_2 (Ca^{2+}), respecto a aquellos sumergidos en agua (grupo control) (**Figura 23**). Después del almacenamiento postcosecha (8+2d), no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado (**Figura 23**).

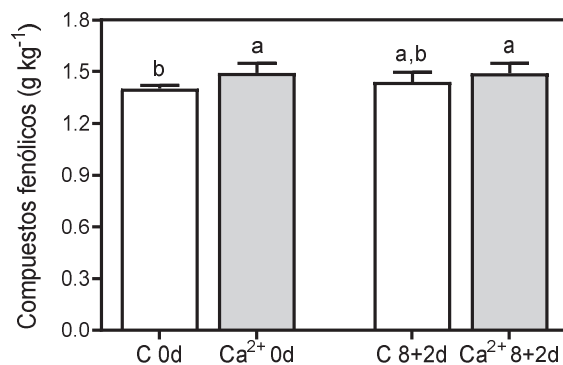


Figura 23. Contenido de compuestos fenólicos totales en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a P < 0,05.

6.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla

6.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular

De forma similar a lo observado para el tratamiento térmico (Capítulo I, Sección 5.2.1), como las diferencias en los niveles de firmeza en frutos tratados con CaCl₂ y frutos controles se detectaron después del almacenamiento refrigerado + estantería (8+2d) (**Figura 21.A**), se utilizaron estas muestras para estudiar el efecto del tratamiento en el contenido y composición de la pared celular (aislada como RIAs). Como resultado, no se observaron diferencias en la cantidad de pared celular total entre controles y frutos tratados (**Figura 24.A**). Sin embargo, se detectaron diferencias en cuanto a la composición de la pared cuando se evaluó el efecto del tratamiento con CaCl₂ en el contenido de pectinas totales y cuando los RIAs de ambos grupos se fraccionaron de manera secuencial. Considerando el contenido de pectinas totales, se observó una cantidad significativamente mayor de estos polímeros en frutos tratados respecto a los controles (**Figura 24.B**). Del aislamiento secuencial de pectinas, se observó un leve aumento (10%) del contenido de pectinas solubles en agua o unidas por interacciones débiles (PSA) en frutos tratados con CaCl₂ comparado con los controles (**Figura 24.C**). Remarcablemente, se observó que el contenido de pectinas solubles en EDTA (PSE, o unidas por interacciones iónicas) fue un 25% mayor en frutos tratados que en controles (**Figura 24.D**), mientras que no se evidenciaron diferencias significativas respecto al contenido de pectinas solubles en ácido clorhídrico o unidas por interacciones covalentes (PSH) (**Figura 24.E**). Si bien se observó una tendencia hacia un mayor contenido de hemicelulosas en frutos tratados respecto a controles, la misma no fue significativa (**Figura 24.F**), pero sí lo fue en cuanto al contenido total de celulosa (**Figura 24.G**). Finalmente, se observó un mayor contenido de azúcares neutros en

pectinas totales extraídas de RIAs de frutos tratados comparado con los controles (**Figura 24.H**).

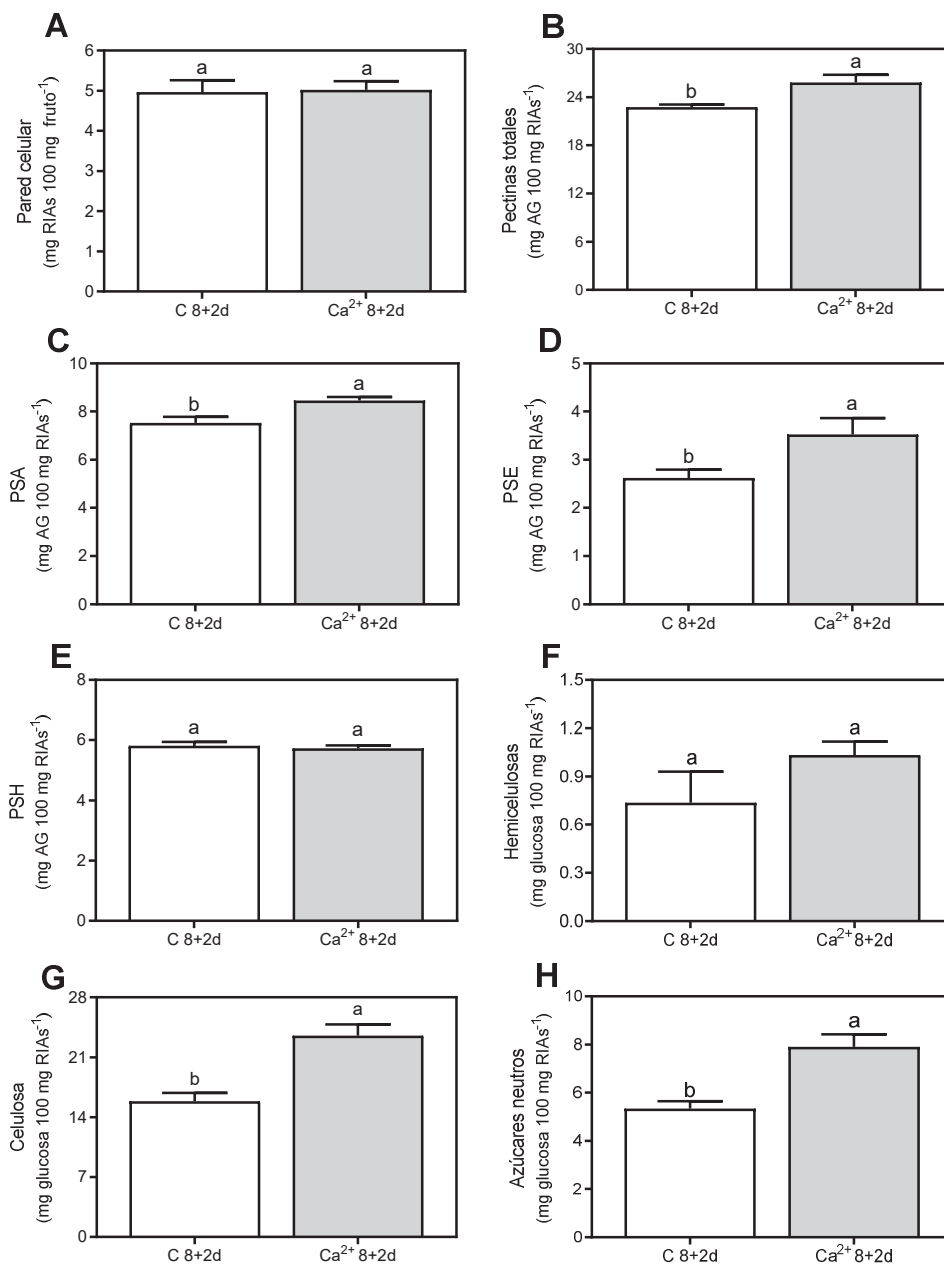


Figura 24. Contenido de pared celular total (extraída como RIAs) por cada 100 mg de fruto (**A**). Contenido de pectinas totales (**B**) y de los principales polímeros constituyentes en 100 mg de RIAs: pectinas solubles en agua (PSA, **C**), pectinas solubles en EDTA (PSE, **D**), pectinas solubles en HCl (PSH, **E**), hemicelulosas (**F**), celulosa (**G**) y azúcares neutros (**H**) en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺) a 8+2d. Las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas y los resultados se analizaron con el test t-Student. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a P < 0,05.

6.3.2.2. Hidratación *in vitro* de la pared celular

Se evaluó la hidratación *in vitro* de RIAs provenientes de frutillas controles y tratadas con CaCl_2 , tanto inmediatamente después del tratamiento (0d) como luego del almacenamiento refrigerado + estantería (8+2d) (**Figura 25.A**).

Como resultado, las alturas de los RIAs hidratados de frutos controles y tratados fueron similares entre sí a 0d y luego disminuyeron a 8+2d (**Figura 25.B**). Sin embargo, si bien las diferencias no fueron significativas (**Figura 25.B**), se observó que las alturas de los RIAs de frutos controles fueron ligeramente menores a las de los tratados con CaCl_2 al final del almacenamiento. De esta manera, las hidrataciones de los RIAs de frutos controles y tratados a 0d, se correspondieron con aquellas observadas para frutos en estadio de maduración 80%R, mientras que aquellas evaluadas a 8+2d, fueron más cercanas a las descriptas para frutos sobremaduros, especialmente en los frutos controles (**Inset en Figura 25.B**).

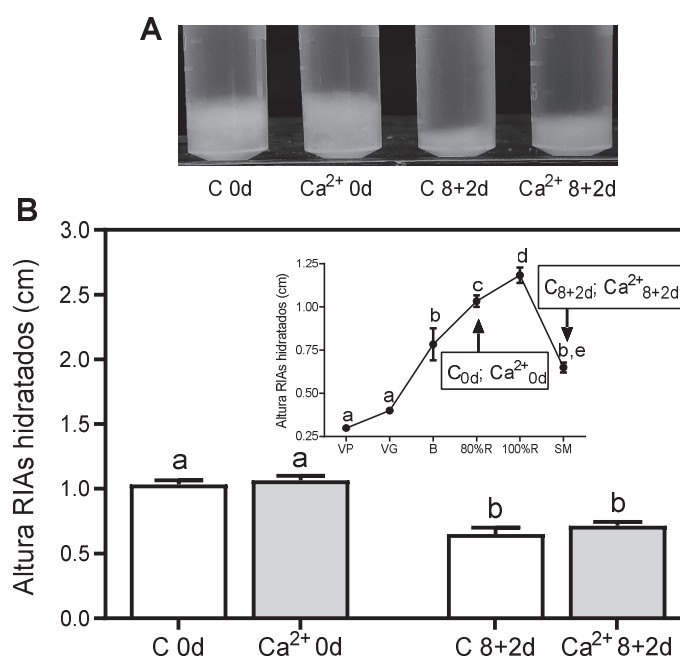


Figura 25. Hidratación *in vitro* de paredes celulares (A) y alturas de los RIAs hidratados *in vitro* (B) de frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Representación gráfica de la altura de los sedimentos de RIAs hidratados de distintos estadios de maduración de frutilla y, comparación con controles y tratados con CaCl_2 , a 0d y 8+2d (figura interna en B). Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresión relativa *FaPME*, *FaPG* y *FaPL*

Se evaluó la respuesta al tratamiento con CaCl_2 de las actividades pectin metilesterasa y poligalacturonasa, así como de la expresión de los genes *FaPME1* y *FaPG1*.

La actividad PME total se incrementó después del almacenamiento (8+2d) respecto a 0d tanto para frutos tratados como para los controles, y la misma fue significativamente mayor en frutos tratados con CaCl_2 respecto al grupo control a ambos tiempos evaluados (0d y 8+2d) (**Figura 26.A**). Se analizó el efecto del tratamiento térmico en el grado de esterificación de pectinas totales y, en concordancia con los resultados de actividad PME total, se detectó un menor GE en frutos tratados comparado con los controles, tanto a 0d como a 8+2d (**Figura 26.B**). Asimismo, se observó una regulación positiva de la expresión *FaPME1* en frutos tratados con CaCl_2 a 0d (**Figura 26.C**), mientras que a 8+2d la expresión *FaPME1* disminuyó en frutos tratados, y no se observaron diferencias en comparación con los controles (**Figura 26.C**).

El tratamiento con CaCl_2 disminuyó significativamente la actividad PG total a 0d y también después del almacenamiento refrigerado + estantería cuando se comparó con frutos no tratados (**Figura 26.D**). Se observó una regulación negativa de la expresión del gen *FaPG1* en frutos tratados con CaCl_2 en comparación con frutos controles en el día cero, mientras que luego del almacenamiento, la expresión *FaPG1* disminuyó tanto en frutos tratados como controles y no se detectaron diferencias entre ellos (**Figura 26.E**).

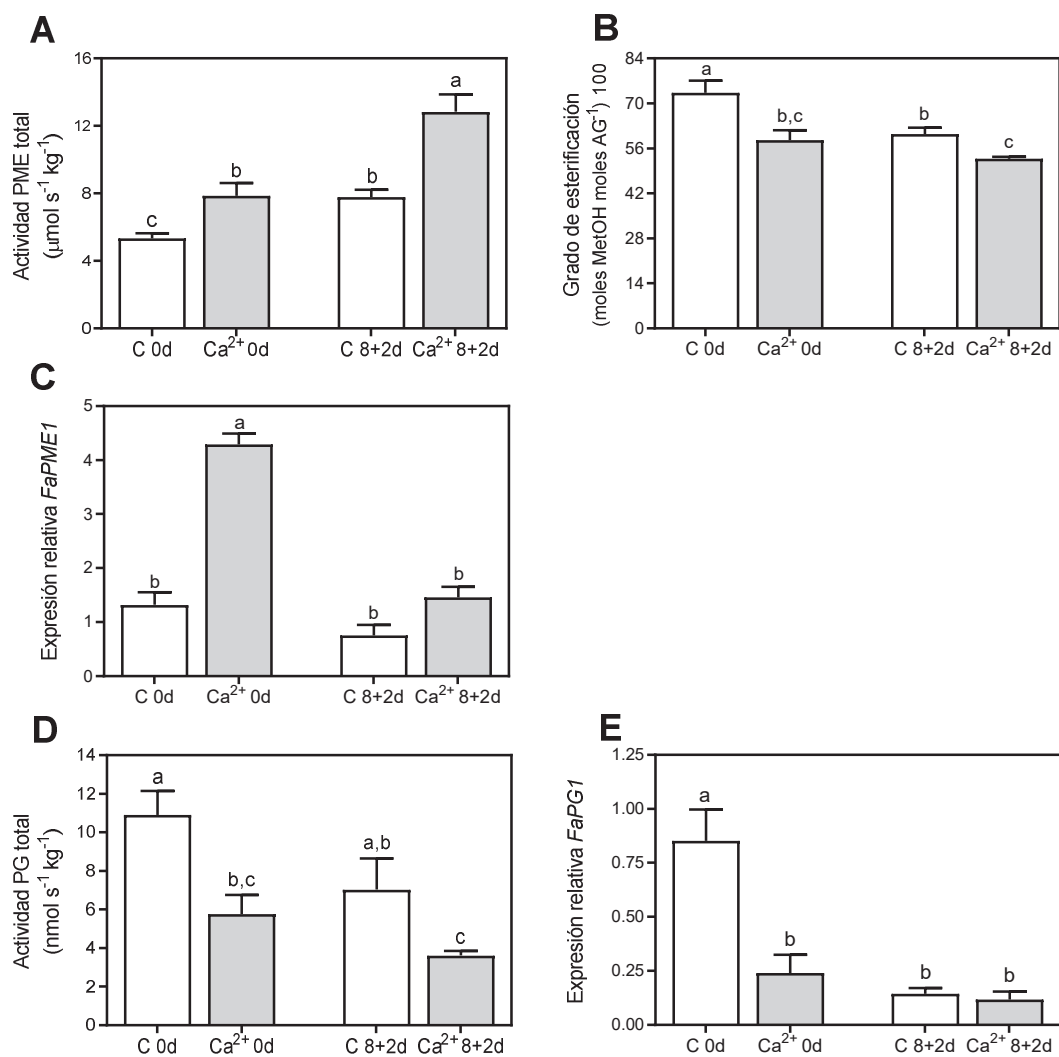


Figura 26. Actividad PME total (A), grado de esterificación (B), expresión relativa *FaPME1* (C), actividad PG total (D) y expresión relativa *FaPG1* (E) en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A, B y D, y cinco réplicas en C y E. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Se estudió asimismo el efecto de la inmersión en la solución de CaCl₂ sobre el patrón de expresión de los genes de la familia de las pectato liasas. La expresión *FaPLA* disminuyó después del almacenamiento (8+2d) respecto a 0d para ambos grupos de frutos, pero no se detectaron diferencias en los niveles de expresión entre éstos en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 27.A). Interesantemente, el tratamiento con CaCl₂ provocó una regulación negativa de la expresión *FaPLB*, tanto inmediatamente después del tratamiento como luego del

almacenamiento (**Figura 27.B**), y también disminuyó la acumulación de transcritos *FaPLC* respecto a los frutos controles, inmediatamente después del tratamiento (**Figura 27.C**). Luego del almacenamiento (8+2d), la expresión de *FaPLC* mostró un valor promedio menor en frutos tratados respecto a controles, si bien la diferencia no fue significativa (**Figura 27.C**).

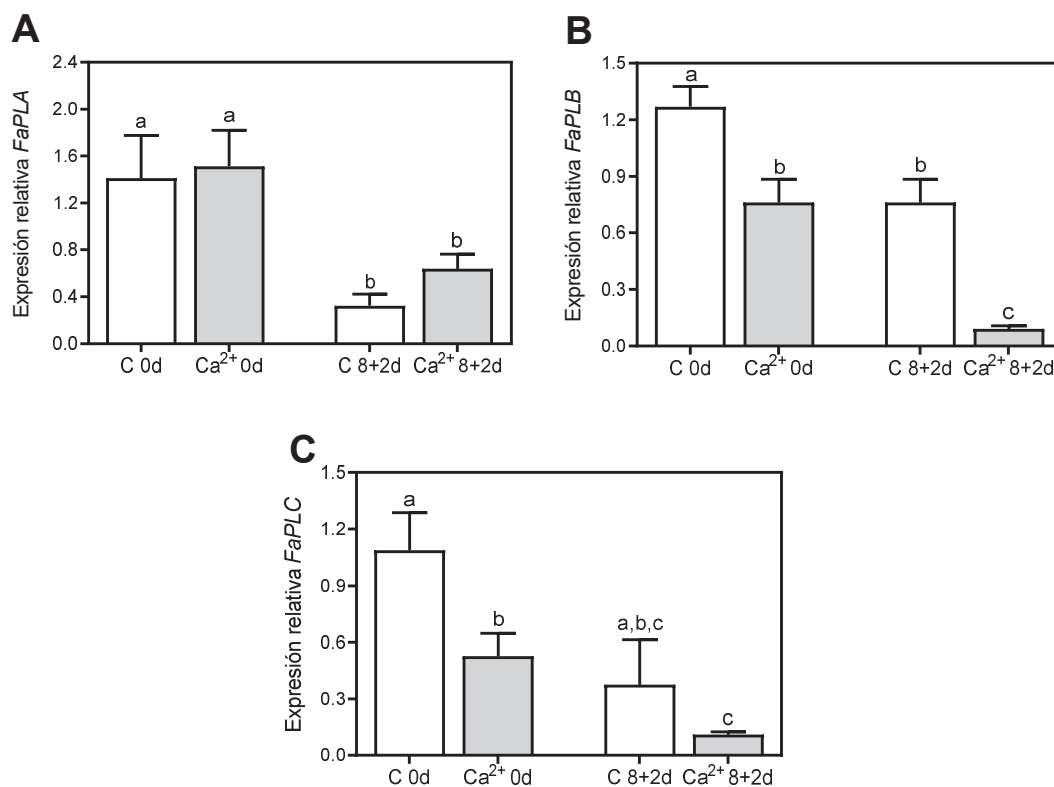


Figura 27. Patrón de expresión de genes codificantes de pectato liasas putativas, *FaPLA* (**A**), *FaPLB* (**B**) y *FaPLC* (**C**) en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media ± error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a P < 0,05.

6.3.2.4. Actividades β-Gal y α-Ara totales y expresión relativa *FaβGal* y *FaAra*

Se evaluó la acción del CaCl₂ sobre el metabolismo de cadenas laterales de pectinas. En frutos tratados se observó una inhibición de la actividad β-Gal total comparado con los controles a 0d (**Figura 28.A**). Luego del almacenamiento (8+2d), la actividad β-Gal disminuyó en controles y alcanzó el mismo nivel de actividad que en frutillas tratadas (**Figura 28.A**). De acuerdo con los resultados obtenidos para la actividad β-Gal total, se detectó una regulación negativa de *FaβGal1* a 0d en frutos tratados (**Figura 28.B**) y, a 8+2d, el nivel de transcritos

disminuyó y fue estadísticamente similar para ambos grupos de frutos (**Figura 28.B**). Tampoco se observaron diferencias en la expresión *FaβGal4* entre frutos tratados con CaCl_2 y controles, en ninguno de los dos tiempos analizados (**Figura 28.C**).

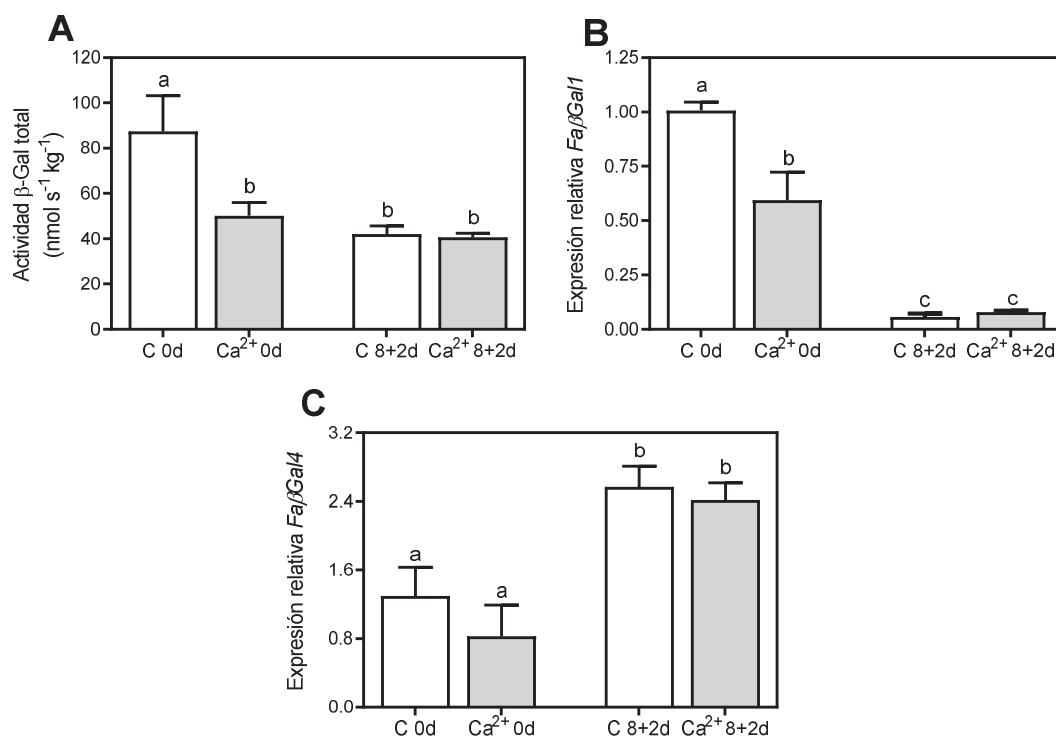


Figura 28. Actividad β -Gal total (**A**) y el patrón de expresión de genes codificantes de los genes *FaβGal1*, y *FaβGal4* (**B** y **C**, respectivamente) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en **A** y cinco réplicas en **B** y **C**. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Considerando el metabolismo de arabinanos, no se observó efecto del tratamiento sobre la actividad α -Ara total (**Figura 29.A**). Sin embargo, la expresión *FaAra1* fue menor a 0d en frutos tratados con CaCl_2 comparado con controles (**Figura 29.B**).

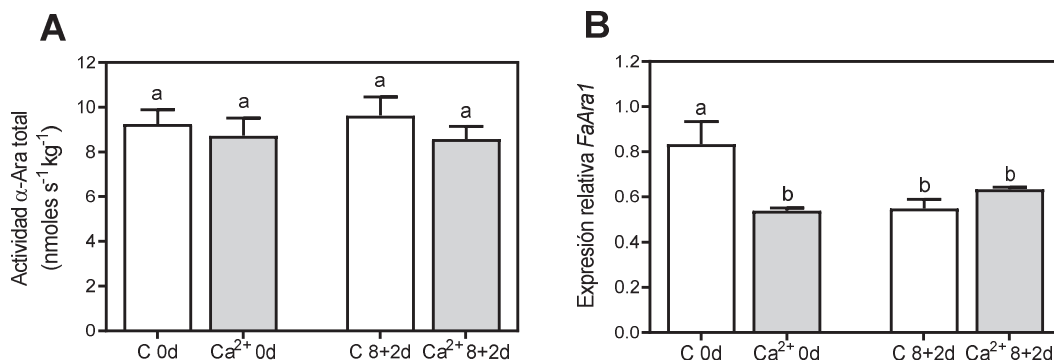


Figura 29. Actividad α -Ara total (A) y expresión relativa *FaAra1* (B) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa *FaXyl*, *FaXTH*, *FaExp* y *FaXyn*

Se evaluó el efecto de las inmersiones en la solución de CaCl_2 sobre la actividad β -Xil total y sobre la expresión de genes codificantes para una β -xilosidasa (*FaXyl1*), una xyloglucano endo-transglicosilasa putativa (*FaXTH1*), dos expansinas (*FaExp2* y *FaExp5*) y dos endoxilanasas putativas (*FaXynA* y *FaXynC*).

El tratamiento con CaCl_2 disminuyó la actividad β -Xil total a 0d y también luego del almacenamiento refrigerado + estantería respecto a frutos controles (Figura 30.A). Respecto a la expresión del gen *FaXyl1* al final del almacenamiento (8+2d), no se observaron diferencias significativas entre frutos controles y tratados en ninguno de los dos tiempos evaluados (Figura 30.B).

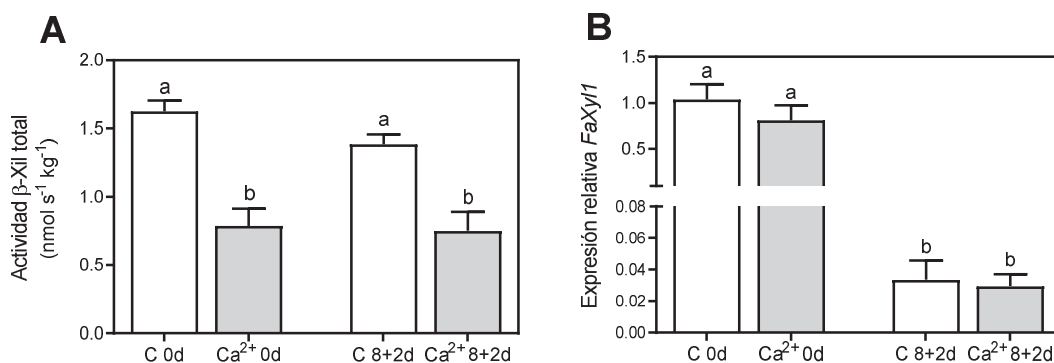


Figura 30. Actividad β -Xil total (A) y expresión relativa *FaXyl1* (B) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las

barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en **A** y cinco réplicas en **B**. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

Para ambos grupos de frutos, se observó una disminución de los niveles de expresión de los genes *FaXTH1* y *FaExp2* y, por el contrario, un aumento de la expresión del gen *FaExp5* después del almacenamiento a 8+2d respecto a 0d (**Figuras 31.A, B y C**, respectivamente). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en la acumulación de ninguno de los transcritos en ningún tiempo analizado, entre frutos tratados con CaCl_2 y controles (**Figuras 31.A, B y C**). En cambio, la inmersión en la solución de CaCl_2 reguló negativamente la expresión *FaXynA* a 0d (**Figura 31.D**), y la de *FaXynC* tanto a 0d como a 8+2d respecto a los frutos no tratados (**Figura 31.E**).

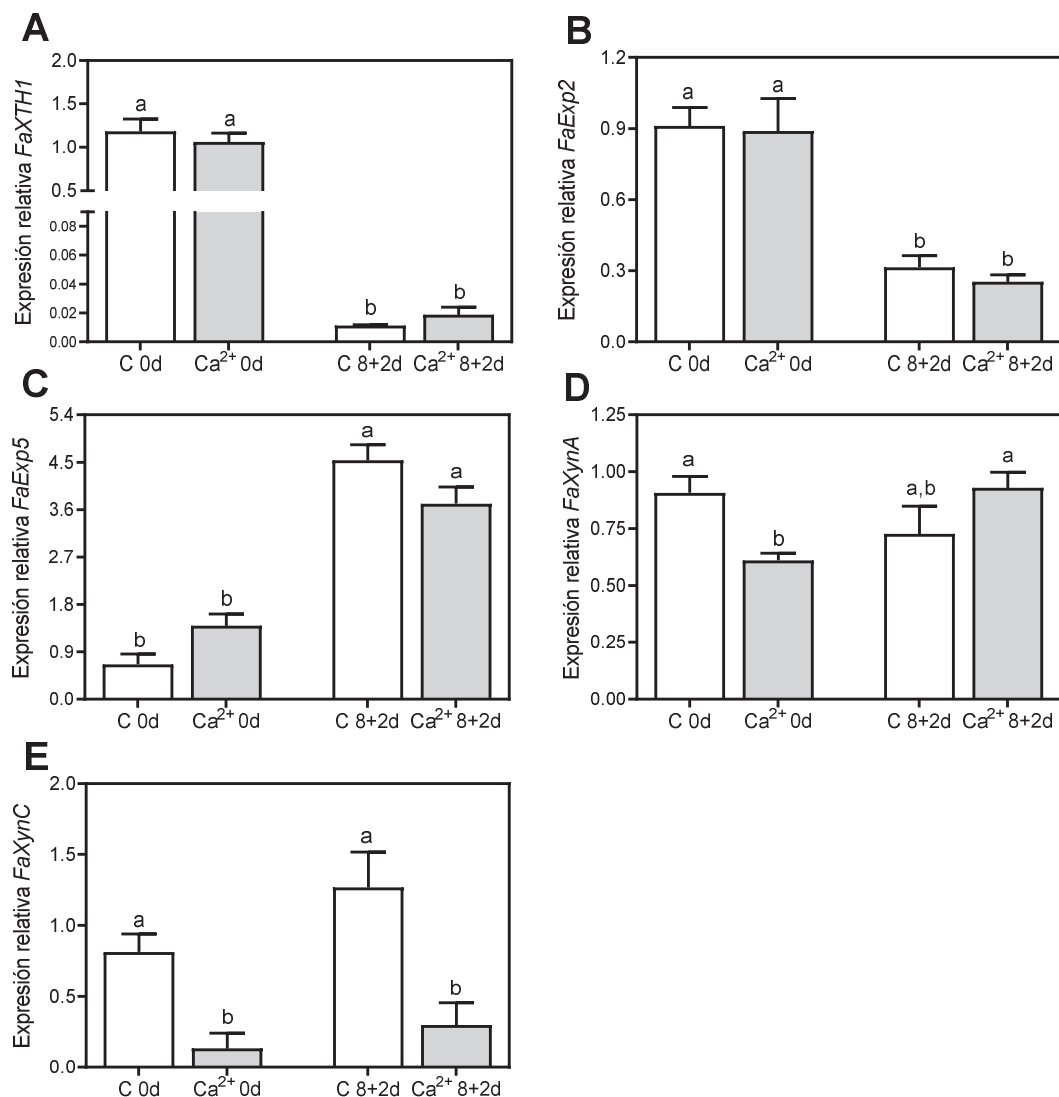


Figura 31. Expresión relativa de *FaXTH1* (A), *FaExp2* (B), *FaExp5* (C), *FaXynA* (D), *FaXynC* (E) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.3. Efecto del tratamiento con CaCl_2 en respuestas de defensa de frutilla

6.3.3.1. Crecimiento *in vivo* de *Botrytis cinerea*

Se estudió el efecto del tratamiento con CaCl_2 sobre la resistencia a la infección por *B. cinerea*. Luego del tratamiento con CaCl_2 (o inmersión en H_2O_d para los controles), los frutos se inocularon con dos gotas de una suspensión de conidios, se almacenaron durante 6 días a 20

°C en oscuridad y se registró cada dos días el desarrollo de las lesiones causadas por *B. cinerea*. Dichas lesiones se clasificaron de acuerdo al grado de severidad como 1) desarrollo de micelio en la zona de inoculación, 2) lesión incipiente más allá de la zona de inoculación + micelio, 3) lesión moderada más allá de la zona de inoculación + micelio, y 4) síntomas de putrefacción.

A los dos días post-inoculación (dpi), el 81% de los frutos controles y el 57% de los frutos tratados con CaCl₂ mostraron micelio inicial en la zona de inoculación (**Figura 32.A**). Luego de 4 dpi, el 17% de los frutos controles mostró micelio en la zona de inoculación, 45% lesión incipiente más allá de la zona de inoculación y micelio, 29% de lesión moderada + micelio, y el 5% síntomas de putrefacción. Por otro lado, a los 4 dpi, los porcentajes de frutos tratados con CaCl₂ con los mismos tipos de lesiones fueron 38%, 50%, 7% y 2%, respectivamente (**Figura 32.B**). A los 6 dpi, los frutos tratados con CaCl₂ continuaron mostrando una reducción en la severidad de la infección fúngica (21% micelio en la zona inoculada, 21% lesión incipiente más allá de la zona inoculada + micelio, 52% lesión moderada más allá de la de la zona inoculada + micelio y 2% síntomas de putrefacción) comparado con controles (5%, 14%, 67% y 10%, respectivamente; **Figura 32.C**).

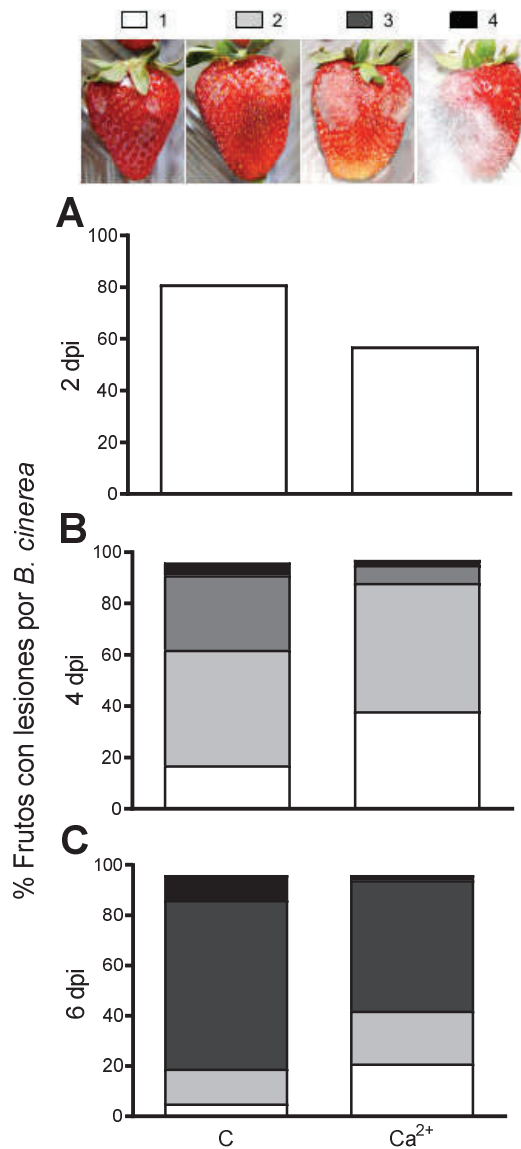


Figura 32. Susceptibilidad a la infección por *B. cinerea* después de 2, 4 y 6 días post-inoculación (dpi) (**A**, **B** y **C**, respectivamente) en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺). Los diferentes grados de daño se clasificaron como: micelio en la zona de inoculación (1, barra blanca); lesión incipiente más allá de la zona de inoculación + micelio (2, barra gris claro); lesión moderada más allá de la zona de inoculación + micelio (3, barra gris oscuro), y síntomas de putrefacción (4, barra negra).

6.3.3.2. Actividad PAL total y expresión relativa *FaPAL* y *FaCHS2*

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad fenilalanina amonio liasa total entre controles y tratados, en cualquiera de los dos tiempos evaluados (**Figura 33.A**). La expresión *FaPAL1* tampoco se vio afectada por el tratamiento con calcio (**Figura 33.B**), mientras que sí se observó una expresión *FaCHS2* significativamente mayor en frutos tratados respecto a los controles al final del almacenamiento (**Figura 33.C**).

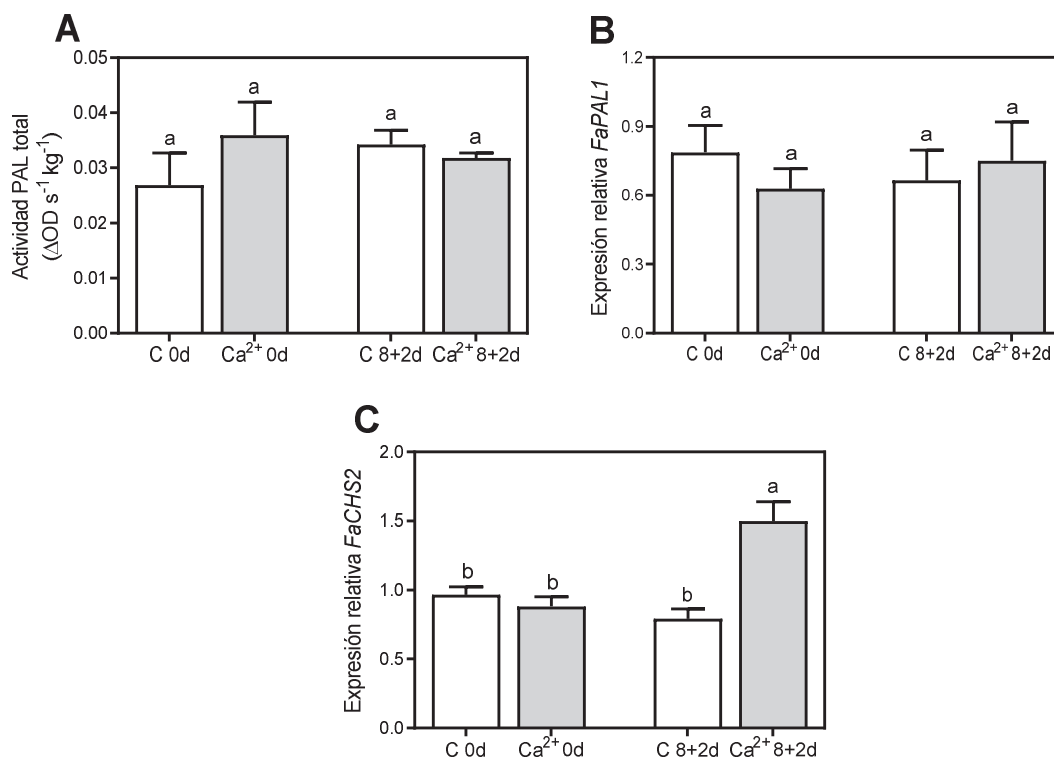


Figura 33. Actividad PAL total (A) y expresiones relativas de *FaPAL1* (B) y *FaCHS2* (C) en frutos control (C) y tratados con $CaCl_2$ (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B y C. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.3.3. Actividades PPO y POD totales

Se detectó un incremento en la actividad polifenol oxidasa total en frutos tratados con $CaCl_2$ en comparación con controles inmediatamente después del tratamiento (0d) (Figura 34.A). Luego del almacenamiento (8+2d), la actividad PPO en frutos tratados disminuyó y alcanzó los niveles correspondientes a los frutos controles (Figura 34.A). Por otra parte, la actividad peroxidasa total fue significativamente mayor en frutos tratados respecto al grupo control, en ambos tiempos analizados (0d y 8+2d) (Figura 34.B).

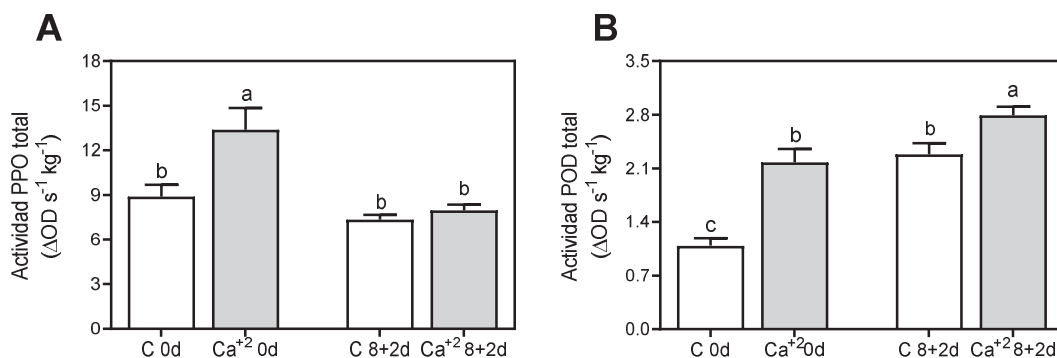


Figura 34. Actividades PPO (A) y POD (B) totales en frutos control (C) y tratados con CaCl₂ (Ca²⁺), a 0d y 8+2d. Las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a P < 0,05.

6.3.3.4. Actividad quitinasa total y expresión relativa *FaChi*

El tratamiento con CaCl₂ aumentó la actividad quitinasa total respecto a los controles, a 0d (Figura 35.A). Este resultado se correlacionó con el aumento de las expresiones relativas de los genes *FaChi2-2* y *FaChi3* en frutos tratados con CaCl₂, al inicio del almacenamiento (0d) (Figuras 35.B y 35.C, respectivamente). Después del almacenamiento (8+2d), no se observaron diferencias significativas en la actividad quitinasa (Figura 35.A), ni en las expresiones *FaChi2-2* y *FaChi3* (Figuras 35.B y 35.C) entre controles y tratados.

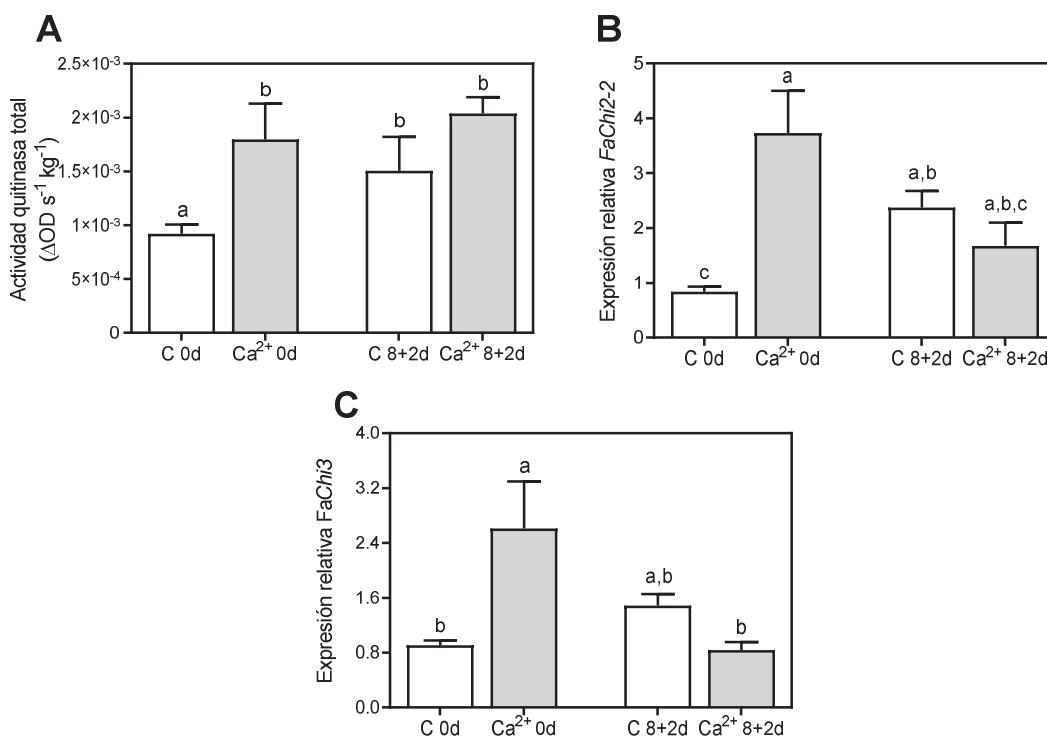


Figura 35. Actividad quitinasa total (A) y expresiones relativas de *FaChi2-2* (B) y *FaChi3* (C) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B y C. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.3.5. Actividad β -1,3-glucanasa total y expresión relativa *Fa β G2,3*

La actividad β -1,3-glucanasa total fue significativamente mayor en frutos tratados con CaCl_2 después del almacenamiento comparado con los frutos controles (Figura 36.A). Respecto a la expresión *Fa β G2,3* la misma fue mayor en frutos tratados respecto a los controles a 0d, si bien fue menor luego del almacenamiento (Figura 36.B).

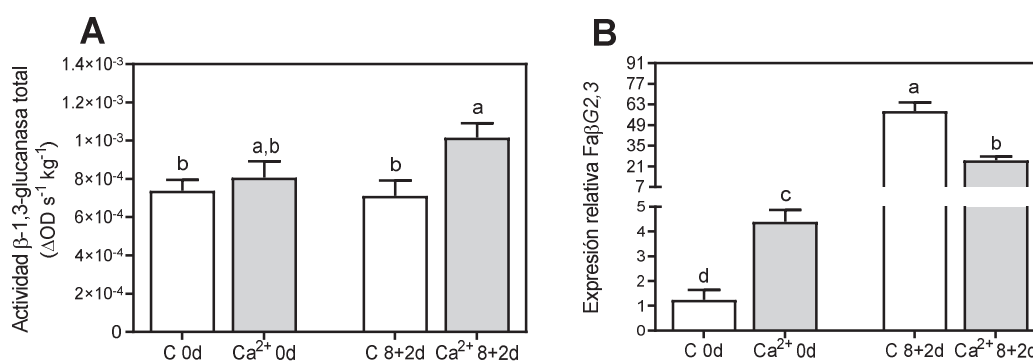


Figura 36. Actividad β -1,3-glucanasa total (A) y expresión relativa *Fa β G2,3* (B) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.3.3.6. Expresión relativa *FaPR* y *FaPGIP*

No se observaron diferencias significativas en las expresiones *FaPR5* y *FaPGIP* entre frutos tratados con CaCl_2 y controles a 0d (Figura 37.A y 37.B, respectivamente). Luego del almacenamiento (8+2d), las mismas aumentaron respecto a 0d, pero fueron menores en frutos tratados respecto a los controles.

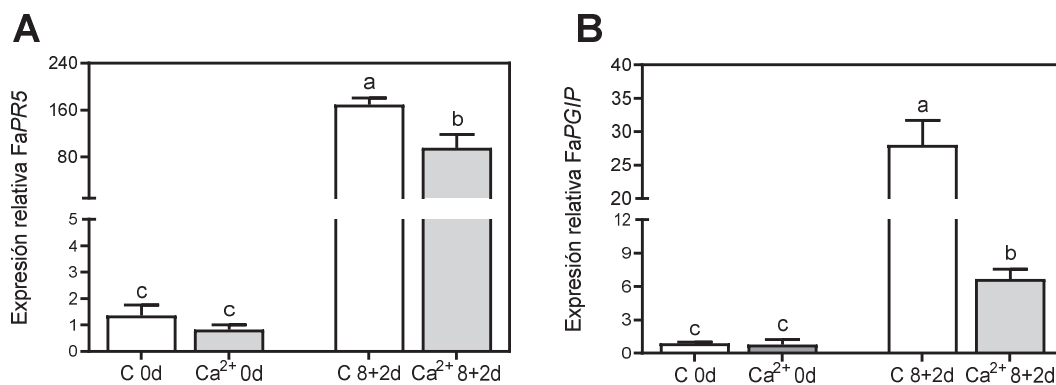


Figura 37. Expresiones relativas *FaPR5* (A) y *FaPGIP* (B) en frutos control (C) y tratados con CaCl_2 (Ca^{2+}), a 0d y 8+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

6.4. Discusión

La capacidad de los tratamientos con iones calcio para preservar la estructura de la pared celular de frutilla fue estudiada por otros grupos de investigación a través de aproximaciones físico-químicas, tales como como la determinación de la composición de mono- y polisacáridos de la pared celular, a través de microscopía de transmisión electrónica, resonancia magnética nuclear, cromatografía líquida de alto rendimiento y la técnica de espectroscopía de fuerza atómica (Lara y col., 2004; Zhang y col., 2018). En el presente trabajo de Tesis, se exploraron las bases bioquímicas y moleculares que permitirían explicar la eficacia del tratamiento con iones calcio para preservar la estructura de la pared celular de frutilla.

De manera similar a los resultados reportados para frutillas sumergidas en soluciones de gluconato de calcio 1% p/v y de CaCl_2 2% p/v (Hernández-Muñoz y col., 2006; Zhang y col., 2018), en el presente trabajo se observó un mayor nivel de firmeza en los frutos tratados con CaCl_2 1% p/v después del almacenamiento refrigerado durante 8 días + 2 días en estantería, comparado con frutos no tratados.

Cuando se analizó el contenido total de pared celular, no se observaron diferencias significativas entre frutos controles y tratados. Sin embargo, la inmersión en la solución de CaCl_2 afectó la composición de la pared celular, incrementando particularmente el contenido de pectinas unidas iónicamente (o PSE) así como el de azúcares neutros de cadenas laterales de pectinas, comparado con controles. En este sentido, se reportó que la incorporación de iones

exógenos de calcio por los frutos de frutilla aumentó el contenido de pectinas solubles en soluciones quelantes, incrementando la estabilidad de la pared celular y previniendo la disolución de la lámina media (Lara y col., 2004; Zhang y col., 2018). Notablemente, Zhang y col. (2018) informaron que, después del tratamiento con iones calcio y el almacenamiento en frío, las paredes celulares de frutillas del cultivar Sijichun presentaron estructuras entrecruzadas y una menor degradación de las estructuras lineales, ramificadas y poliméricas en comparación con las frutillas no tratadas. Adicionalmente, los autores observaron que los frutos tratados con calcio poseían porcentajes mayores de pectinas unidas iónicamente más largas y anchas (largo ≥ 800 nm y ancho ≥ 90 nm) que los frutos controles.

De acuerdo a nuestro conocimiento, el presente trabajo de Tesis doctoral constituye el **primer reporte** del efecto del ión calcio sobre actividades de enzimas relevantes en el metabolismo de pectinas de frutilla, tales como PME, PG, β -Gal y α -Ara. El tratamiento con calcio incrementó la actividad total PME, y este resultado fue confirmado al realizar el ensayo de grado de esterificación. Por otro lado, la sumersión en la solución de CaCl_2 inhibió tanto la actividad poligalacturonasa total como la correspondiente a β -galactosidasa.

Se estudió el efecto de los iones calcio en la expresión de genes que se expresan específicamente en el fruto y/o aquellos genes que fueron caracterizados funcionalmente a través de tecnologías antisentido, y que se probó que son relevantes en la determinación de la firmeza de los frutos de frutilla (*FaPME1*, *FaPG1*, *FaPLB*, *FaPLC*, *Fa β Gall*, *Fa β Gal4* y *FaAra1*). Se detectó una regulación positiva de *FaPME1* y una regulación negativa de *FaPG1*, *FaPLB*, *FaPLC*, *Fa β Gall* y *FaAra1* en frutos tratados con calcio respecto a controles. Notablemente, el efecto más pronunciado del tratamiento con CaCl_2 tanto en actividades enzimáticas como en expresiones génicas, fue antes del almacenamiento (a 0d). Estos resultados sugieren que la mayor firmeza y una pared celular con una estructura más preservada en frutos tratados con CaCl_2 después del almacenamiento estaría íntimamente relacionada con la regulación negativa de los genes involucrados en el desensamblaje de las pectinas (*FaPG1*, *FaPLB*, *FaPLC*, *Fa β Gall*), así como la regulación positiva de *FaPME1* inmediatamente después de la inmersión en la solución de CaCl_2 . De esta manera, los iones calcio estarían manteniendo la estructura de las pectinas unidas por interacciones iónicas de la pared celular y lámina media a través del incremento de la actividad PME y la expresión de su gen relacionado, permitiendo la formación de un mayor número de puentes de calcio entre pectinas de-esterificadas y, simultáneamente, a través de la disminución de la actividad de enzimas y expresión de genes clásicamente asociados con de degradación de pectinas.

Respecto al efecto del tratamiento con CaCl_2 en el metabolismo de hemicelulosas, el mismo disminuyó la actividad β -Xil y se evidenció una regulación negativa de las expresiones *FaXynA* y *FaXynC* en frutos tratados comparado con controles. Sin embargo en líneas generales el tratamiento con CaCl_2 no produjo diferencias significativas en el patrón de expresión de otros genes vinculados con la modificación de la fracción hemicelulósica (*FaXyl1*, *FaExp2*, *FaExp5* y *FaXTH1*). En este sentido, no se observaron diferencias en el contenido de hemicelulosas en paredes celulares de frutos tratados respecto a controles, lo cual podría explicarse en parte con los resultados mencionados.

Cuando se evaluó la capacidad de *B. cinerea* para crecer en un medio conteniendo paredes celulares aisladas (RIAs), así como en la superficie de los frutos frescos, se detectó en frutos tratados con CaCl_2 una reducción en el área de crecimiento, así como también una disminución en el porcentaje de frutos con lesiones de gran severidad, comparado con controles. Una menor velocidad de crecimiento e infección de *B. cinerea in vitro* e *in vivo* podría ser consecuencia del fortalecimiento de la pared celular (el cual limitaría la accesibilidad de las hidrolasas del patógeno a sus sustratos en la planta), y/o de la activación de respuestas de defensa. En este sentido, Lara y col. (2004) sugirieron que una mayor resistencia de frutilla al ataque fúngico podría deberse a que el tratamiento con CaCl_2 es capaz de incrementar la biosíntesis de proteínas protectoras del fruto. Teniendo en cuenta esto, se estudió el efecto de los iones calcio sobre un conjunto de actividades enzimáticas relacionadas con la defensa de las plantas contra la invasión patogénica. Las actividades PPO, POD y quitinasa totales se incrementaron en frutos tratados con CaCl_2 superando los niveles encontrados en controles después del tratamiento (0d). Asimismo, se observó una mayor actividad β -1,3-glucanasa total en frutos tratados con calcio, luego del almacenamiento refrigerado + estantería. Más aún, el aumento en la expresión de *FaChi2-2*, *FaChi3* y *Fa β G2,3* en frutos tratados con CaCl_2 contribuiría al aumento de la actividad total de las enzimas asociadas. En relación a los resultados obtenidos, si bien se informó el incremento de las actividades de enzimas de defensa en frutillas sometidas a tratamientos postcosecha tales como irradiación UV-C y tratamiento con metil jasmonato (Pombo y col., 2011a; Asghari y Hasanlooe, 2016), el presente trabajo de Tesis, constituye **el primer reporte** del efecto del tratamiento con iones calcio en estas actividades.

Finalmente, de manera similar a lo sugerido en el Capítulo I respecto a los efectos del tratamiento térmico, si bien los iones calcio podrían actuar directamente en la activación de estas enzimas de defensa, también es posible que frutos tratados respondan a elicitores vegetales generados a través del incremento de la actividad PME activada por calcio.

6.5. Conclusiones

Se postula que el mantenimiento de las pectinas unidas por interacciones iónicas en frutos tratados con cloruro de calcio está relacionado con el incremento simultáneo de la actividad pectin metilesterasa, y la inhibición de hidrolasas pécticas tales como poligalacturonasas, pectato liasas y β -galactosidasas. Asimismo, si bien se requieren estudios adicionales, es posible que una regulación positiva de *FaPME1* debido a la inmersión en la solución de calcio, induzca las respuestas de defensa observadas en los frutos tratados, y contribuya a una invasión fúngica más restrictiva, preservando las propiedades de calidad de frutilla.

7. CAPÍTULO III: TRATAMIENTO CON 1-MCP

7.1. Introducción

El 1-metilciclopropeno es un inhibidor efectivo de la percepción del etileno considerado de bajo riesgo para la salud humana (Watkins, 2006). Es un compuesto gaseoso en condiciones normales de presión y temperatura que actúa bloqueando el acceso del etileno a su sitio en los receptores, por lo que los tejidos vegetales se vuelven incapaces de percibir la presencia de esta hormona gaseosa (Watkins, 2006). Actualmente, el 1-MCP es un compuesto prometedor para ralentizar la maduración de frutos climatéricos, incluidos las manzanas y las peras (Kolniak-Ostek y col., 2014; Shu y col., 2020). Sin embargo, un número creciente de investigaciones mostró que el tratamiento con 1-MCP es capaz de preservar la firmeza durante la postcosecha de frutos no climatéricos, como la berenjena y la cereza (Massolo y col., 2011; Serradilla y col., 2019).

Como se mencionó en la sección 2.1.3.1., parte de los estudios sobre el efecto de la hormona etileno en el metabolismo de la pared celular de frutilla se llevaron a cabo en frutos en estadio blanco (Villarreal y col., 2010; Nardi y col., 2014; Villarreal y col., 2016) y los reportes del efecto de la inhibición de la percepción de esta hormona mediante la aplicación de 1-MCP también se llevó a cabo en este estadio inmaduro. En este sentido se informó que la expresión PME aumenta significativamente en frutos blancos tratados con 1-MCP, mientras que el tratamiento provocó una regulación negativa de la expresión poligalacturonasa (Villarreal y col., 2016).

En frutillas maduras, los efectos beneficiosos de la aplicación postcosecha del 1-MCP incluyen: la mejora de la calidad de la fruta, la reducción de podredumbres, y el retraso tanto en la acumulación de antocianinas como en la pérdida de firmeza del fruto (Jiang y col., 2001; Silva y col., 2012; Chaiprasart, 2016).

Sin embargo, a pesar de estos valiosos aportes, al momento del inicio de la presente Tesis doctoral, la información sobre las bases bioquímicas y moleculares que conducen a la preservación de la calidad de frutillas cosechadas en estadios de madurez comercial mediante la aplicación de 1-MCP era muy escasa. De esta manera, el presente Capítulo se enfocó fundamentalmente en contribuir al conocimiento de la respuesta de una estructura plástica como la pared celular al tratamiento con 1-MCP y a su posible efecto en respuestas de defensa en frutillas maduras.

7.2. Antecedentes

7.2.1. Firmeza, antocianinas y pH

No se observaron diferencias significativas en los valores de firmeza entre los frutos tratados con 1-MCP y los frutos control, a 0d (**Figura 38.A**). Después del almacenamiento refrigerado + estantería (10+2d), la firmeza de los frutos disminuyó tanto para los frutos control como para los tratados. Sin embargo, se destaca que, los frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP presentaron un nivel de firmeza significativamente mayor que los controles (**Figura 38.A**).

Los frutos tratados con 1-MCP presentaron un contenido menor de antocianinas que los controles después de 10 h en contacto con el inhibidor de la percepción de etileno (0d) (**Figura 38.B**). Luego del almacenamiento (10+2d), los frutos controles presentaron un aumento natural de la cantidad de antocianinas mientras que la fruta tratada con 1-MCP mantuvo niveles similares de estos pigmentos a los observados en las condiciones iniciales (0d) (**Figura 38.B**).

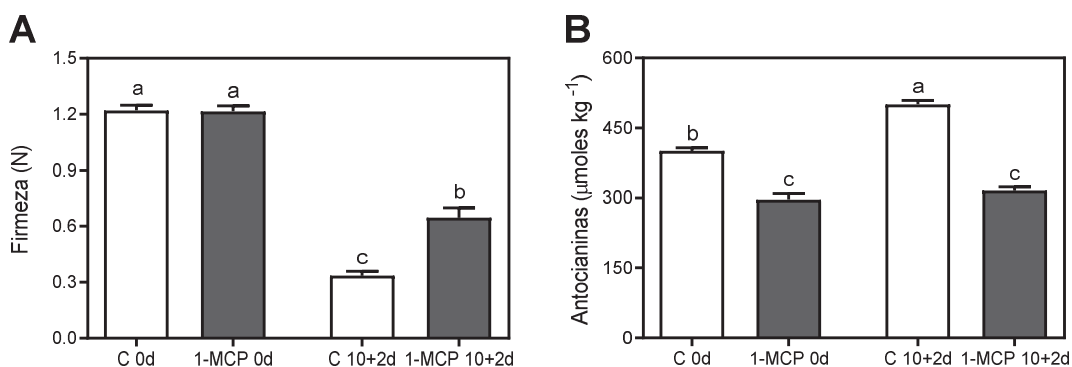


Figura 38. Nivel de firmeza (A) y contenido de antocianinas (B) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), inmediatamente después del ensayo (0d) y luego de 10 días de almacenamiento a 4 °C + 2 días a 20 °C (10+2d). Las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

No se detectaron diferencias significativas en el pH entre el grupo de frutos tratados y control, a 0d ni a 10+2d (**Tabla 2**).

	Almacenamiento	C	1-MCP
pH	0d	3,72 ± 0,03a	3,77 ± 0,07a
	10+2d	3,74 ± 0,03a	3,80 ± 0,03a

Tabla 2. pH en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), inmediatamente después del ensayo (0d) y luego de 10 días de almacenamiento a 4 °C + 2 días a 20 °C (10+2d). Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre frutos tratados térmicamente y controles a $P < 0,05$.

7.2.2. Crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*

El tratamiento con 1-MCP redujo significativamente el crecimiento *in vitro* de *Botrytis* después de 72 horas post-inoculación (hpi) (**Figura 39.A**).

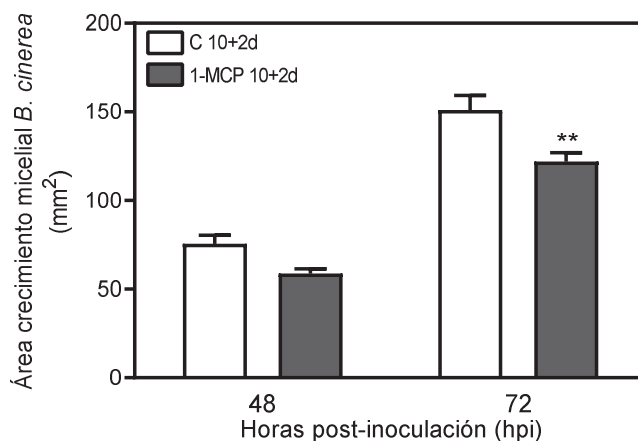


Figura 39. Crecimiento de *Botrytis cinerea*. El patógeno se inoculó en placas de agar 0,8% p/v homogeneizado con 0,2 mg ml⁻¹ de RIAs aislados de frutos control y tratados con 1-MCP, como única fuente de carbono. Las barras representan la media ± error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Dunnett como post-test, y los asteriscos indican diferencias significativas entre frutos tratados y controles (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$).

7.3. Resultados

7.3.1. Parámetros de calidad del fruto

7.3.1.1. Compuestos fenólicos

No se observaron modificaciones respecto al contenido de compuestos fenólicos en frutos tratados respecto a los controles, en ninguno de los dos tiempos evaluados (0d y 10+2d)

(Figura 40), si bien el nivel de estas moléculas disminuyó en frutos tratados al final del almacenamiento refrigerado + estantería (10+2d).

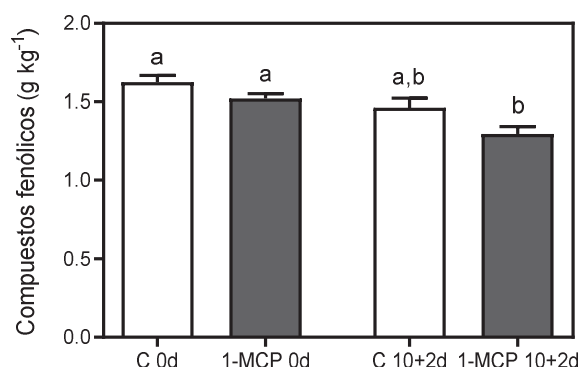


Figura 40. Contenido de compuestos fenólicos en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.2. Metabolismo de la pared celular de frutilla

7.3.2.1. Contenido y composición de la pared celular

No se observaron diferencias significativas en la cantidad de pared celular total entre controles y frutos tratados con 1-MCP (**Figura 41.A**). Sin embargo, el contenido de pectinas totales fue significativamente mayor en frutillas tratadas con 1-MCP, comparado con controles (**Figura 41.B**). Cuando se analizó el efecto del tratamiento con 1-MCP en el contenido de pectinas unidas por interacciones débiles, iónicas y covalentes, se observó un contenido ligeramente mayor de PSA en frutos tratados (**Figuras 41.C**), y un contenido marcadamente mayor de PSE en frutos sometidos al tratamiento con 1-MCP respecto a los controles (**Figura 41.D**). Por otra parte, no se hallaron diferencias en el contenido de PSH entre frutos tratados y controles (**Figura 41.E**). Asimismo, los frutos tratados con 1-MCP presentaron un mayor contenido de hemicelulosas comparado con controles, y no se detectaron diferencias significativas en el contenido de celulosa entre tratados y controles (**Figura 41.G y 41.F**, respectivamente).

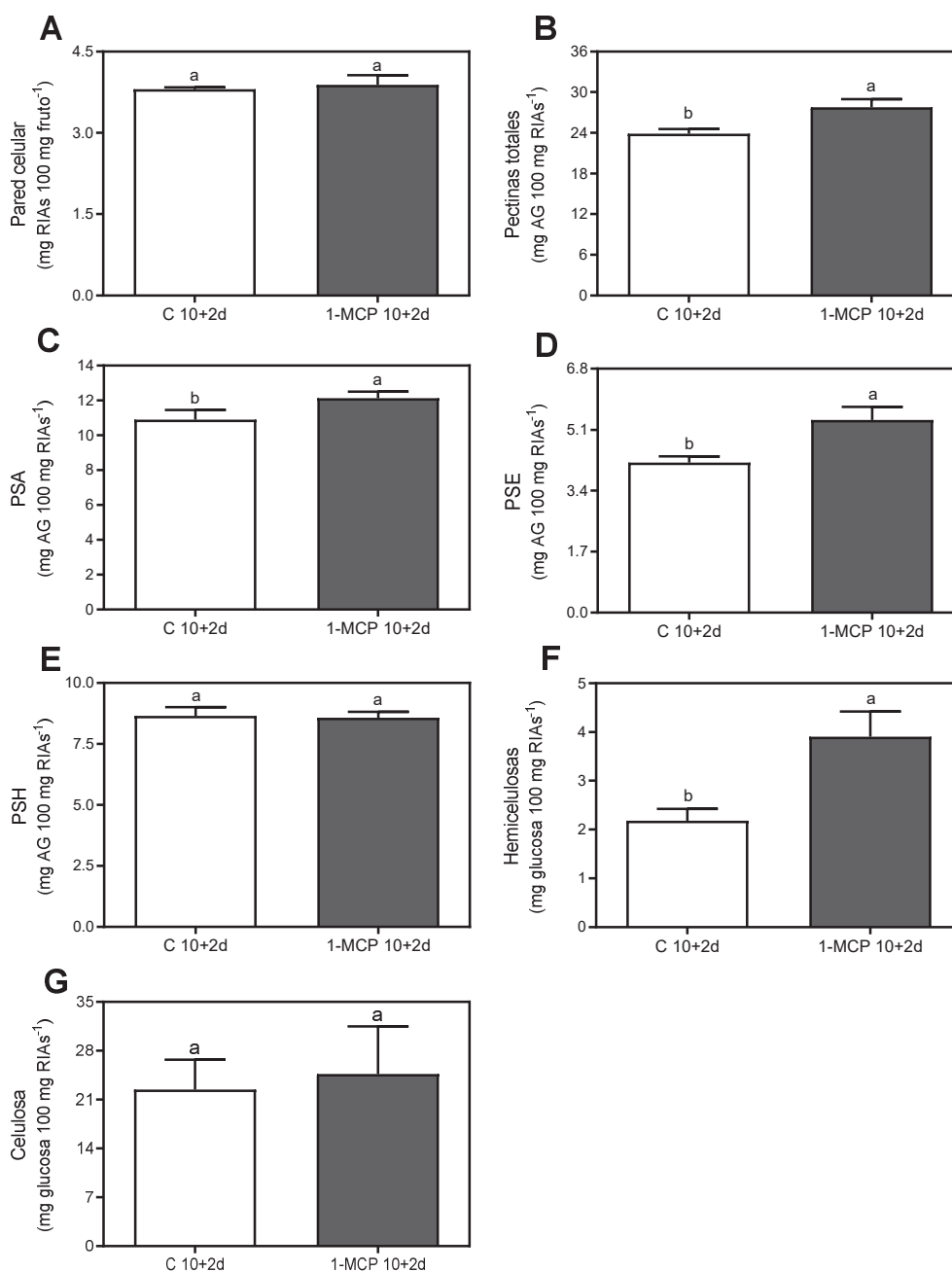


Figura 41. Contenido de pared celular total (extraída como RIAs) por cada 100 mg de fruto (A). Contenido de pectinas totales (B) y de los principales polímeros constituyentes por cada 100 mg de RIAs. PSA (C), PSE (D), PSH (E), hemicelulosas (F) y celulosa (G) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 10+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas y los resultados se analizaron con el test t-Student. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.2.2. Hidratación *in vitro* de la pared celular

Se ensayó la hidratación *in vitro* de paredes celulares de frutos controles y expuestos al tratamiento con 1-MCP, a 0d y a 10+2d (Figura 42.A).

Se observó una altura similar de RIAs hidratados en frutos tratados con 1-MCP y controles a 0d (**Figura 42.B**). Después del almacenamiento (10+2d), la altura de los RIAs hidratados aislados de los frutos controles disminuyó significativamente mientras que la altura de aquellos extraídos de los tratados permaneció similar a las condiciones iniciales (**Figura 42.B**). En comparación con el progreso de la hidratación *in vitro* durante la maduración de la frutilla (figura interna en **Figura 42.B**), las alturas de los RIAs hidratados de controles a 0d y tratados con 1-MCP a 0d y a 10+2d fueron ligeramente menor a la mostrada para RIAs aislados de frutos 80%R, mientras que la altura de los RIAs de frutos no tratados a 10+2d fue ligeramente inferior a la mostrada para frutos sobremaduros (figura interna en **Figura 42.B**).

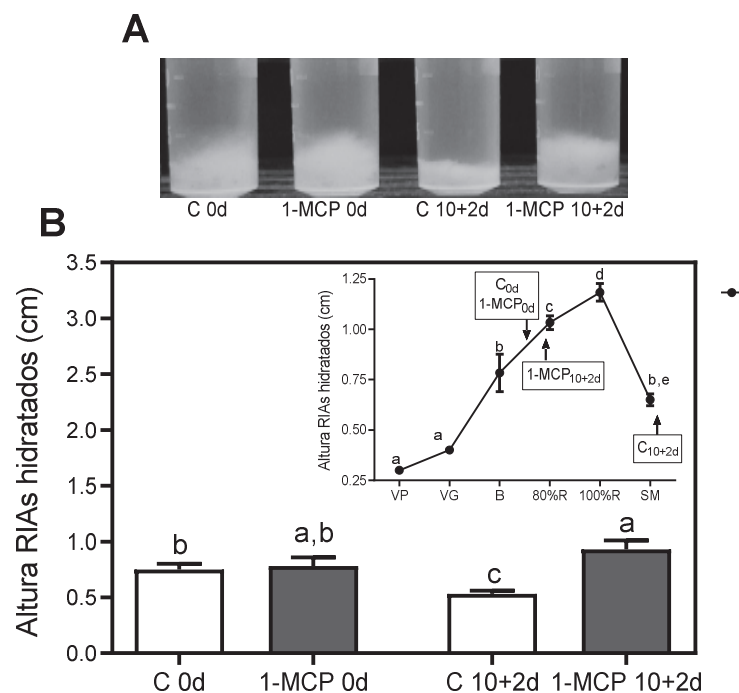


Figura 42. Hidratación *in vitro* de paredes celulares (A) y alturas de los RIAs hidratados *in vitro* (B) de frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP) a 0d y 10+2d. Representación gráfica de la altura de los sedimentos de RIAs hidratados de distintos estadios de maduración de frutilla y, comparación con controles y tratados con 1-MCP, a 0d y 10+2d (figura interna en B). Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas, y los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.2.3. Actividades PME y PG totales, grado de esterificación y expresiones relativas *FaPME*, *FaPG* y *FaPL*

La actividad pectin metilesterasa total en frutos tratados con 1-MCP fue significativamente mayor que en frutos controles, tanto a 0d como a 10+2d (**Figura 43.A**). Asimismo, el grado de esterificación de pectinas totales fue significativamente menor en los frutos tratados en comparación con los controles, a 0d y también después del almacenamiento refrigerado + en estantería (10+2d) (**Figura 43.B**). La expresión relativa del gen *FaPME1* se incrementó notablemente debido al tratamiento con 1-MCP a 0d, en comparación con los frutos no tratados, mientras que no se observaron diferencias en el nivel de expresión después del almacenamiento (**Figura 43.C**).

El tratamiento con 1-MCP inhibió la actividad poligalacturonasa a 0d (**Figura 43.D**) lo que concuerda con la reducción significativa de la expresión *FaPG1* inmediatamente después de la exposición a 1-MCP (**Figura 43.E**).

La abundancia del transcripto *FaPLC* fue significativamente menor en los frutos tratados con 1-MCP comparado con los controles, a 0d (**Figura 43.F**).

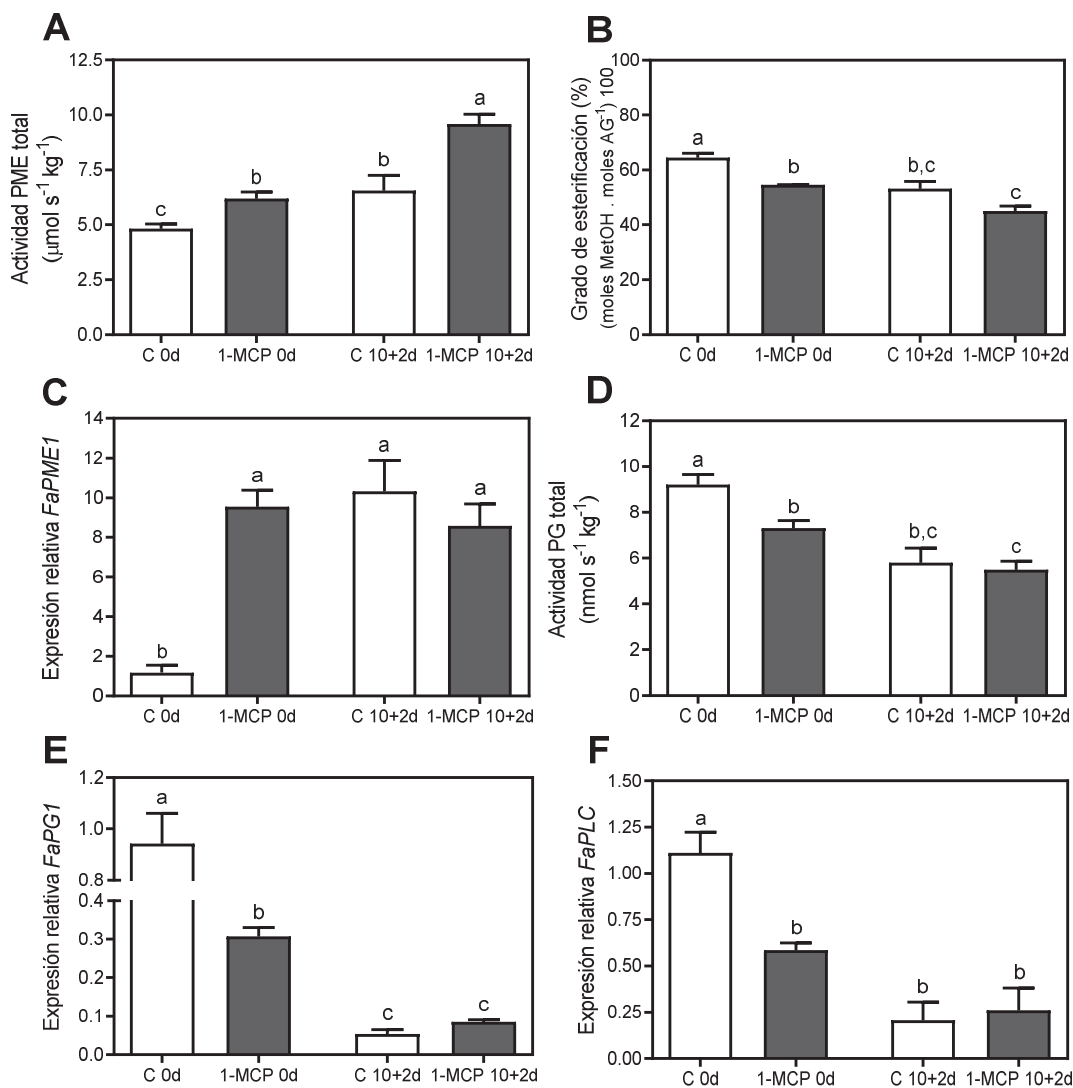


Figura 43. Actividad PME total (A), grado de esterificación (B), expresión relativa *FaPME1* (C), actividad PG total (D), y expresión relativa de *FaPG1* (E) y *FaPLC* (F) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A, B y D, y cinco réplicas en C, E y F. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.2.4. Actividades β -Gal y α -Ara totales y expresión relativa *Fa β Gal* y *FaAra*

La actividad β -galactosidasa fue significativamente menor en frutos tratados con 1-MCP inmediatamente después del tratamiento (0d), mientras que no se observaron diferencias entre tratados y controles después del almacenamiento refrigerado + estantería (10+2d) (Figura 44.A). Por otro lado, el tratamiento con 1-MCP inhibió la expresión relativa del gen *Fa β Gal4* al final del almacenamiento refrigerado + estantería (10+2d) (Figura 44.B).

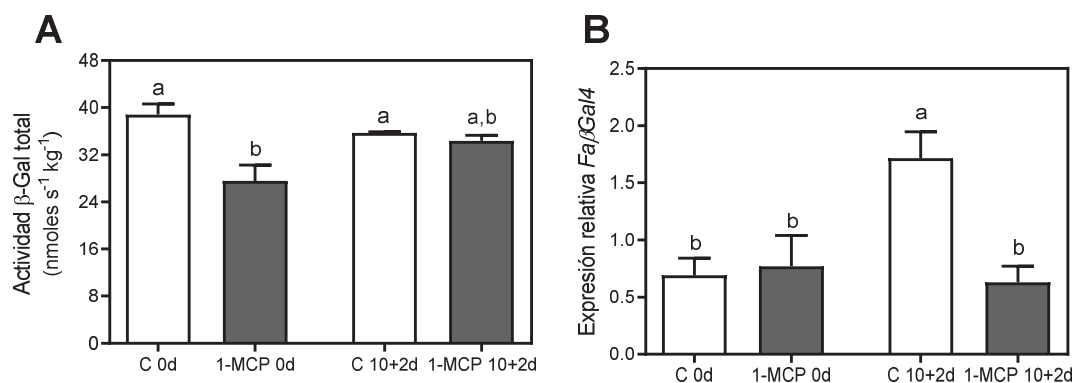


Figura 44. Actividad β -Gal total (A) y expresión relativa de genes de *Fa β Gal4* (B) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

El tratamiento con 1-MCP disminuyó la actividad α -arabinofuranosidasa a 0d (Figura 45.A). Después del almacenamiento (10+2d), la actividad α -Ara disminuyó tanto en controles como en tratados, y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 45.A). La expresión *FaAra1* permaneció sin cambios en 0d y 10+2d, en los frutos controles y tratados, y tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos (Figura 45.B).

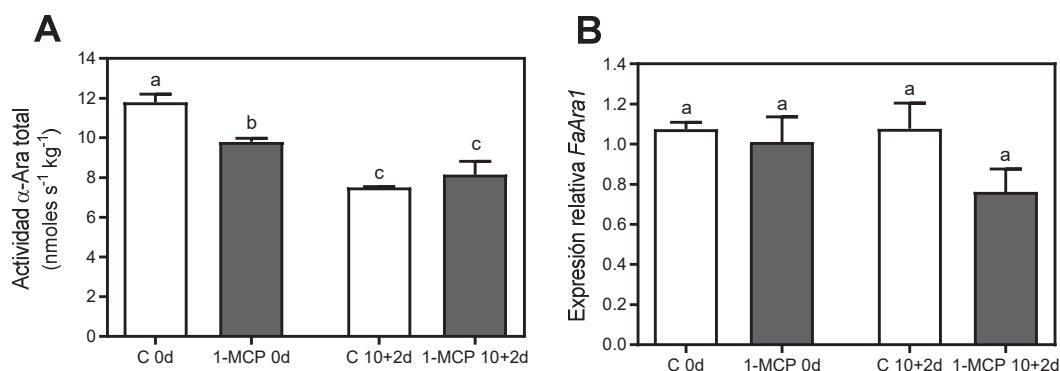


Figura 45. Actividad α -Ara total (A) y expresión relativa *FaAra1* (B) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en A y cinco réplicas en B. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.2.5. Actividad β -Xil total y expresión relativa *FaXyl*, *FaXTH* y *FaXyn*

La actividad de β -xilosidasa se redujo inmediatamente (0d) después del tratamiento con 1-MCP, comparado con los controles (**Figura 46.A**). No se observaron diferencias en la expresión de *FaXyl* entre los dos grupos de frutos, en ninguno de los dos tiempos evaluados (**Figura 46.B**).

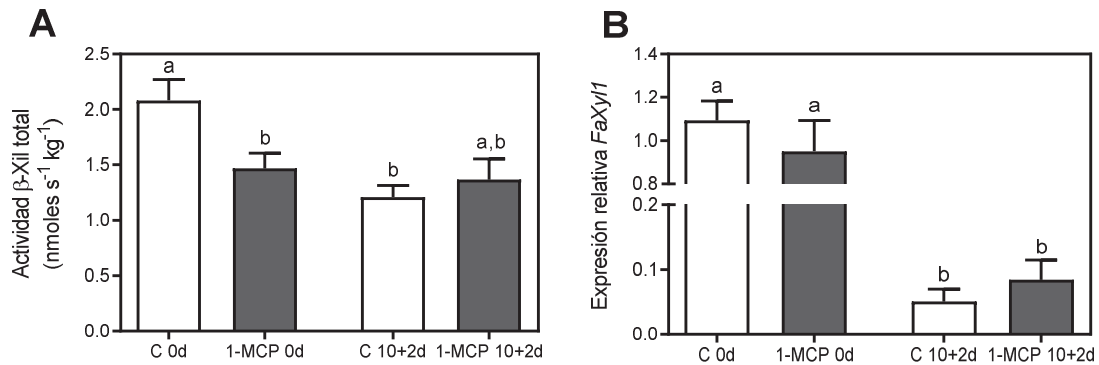


Figura 46. Actividad β -Xil total (**A**) y expresión relativa *FaXyl* (**B**) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Los valores de expresión representan los niveles del gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas en **A** y cinco réplicas en **B**. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

El tratamiento con 1-MCP reguló positivamente la expresión de *FaXTH1* a 0d, mientras que no se detectaron diferencias en la expresión génica entre controles y tratados, después del almacenamiento (**Figura 47.A**). La expresión de *FaXTH2* se reguló negativamente por la exposición a 1-MCP inmediatamente después del tratamiento (0d), y se observaron niveles bajos de expresión génica, similares para los controles y tratados, a 10+2d (**Figura 47.B**).

Las expresiones de *FaXynA* y *FaXynC* aumentaron a 0d en frutos tratados con 1-MCP (**Figuras 47.C** y **47.D**, respectivamente). Luego del almacenamiento refrigerado + estantería, la expresión *FaXynA* disminuyó en ambos grupos de frutos, tratados y controles, aunque los niveles de expresión génica fueron mayores en los frutos tratados con 1-MCP (**Figura 47.C**), mientras que para la expresión *FaXynC* no se observaron diferencias significativas entre tratados y controles, a 10+2d (**Figura 47.D**).

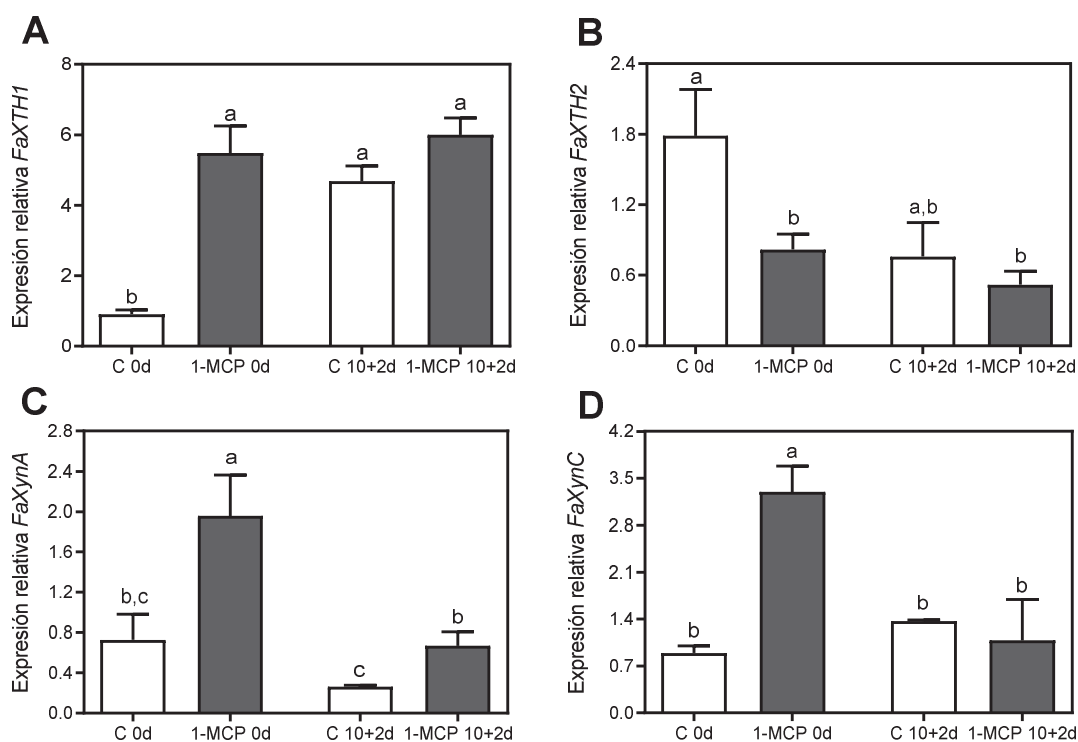


Figura 47. Expresión relativa de *FaXTH1* (A), *FaXTH2* (B), *FaXynA* (C) y *FaXynC* (D), en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Los valores de expresión representan los niveles de cada gen objetivo normalizado ante la abundancia del gen *FaGAPDH1*, utilizando una muestra control como calibrador con un valor nominal de 1. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de cinco réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.3.3. Efecto del tratamiento con 1-MCP en respuestas de defensa de frutilla

7.3.3.1. Crecimiento *in vivo* de *Botrytis cinerea*

Se estudió el efecto del tratamiento con 1-MCP sobre la resistencia a la infección por *B. cinerea*. Para ello, se procedió de igual manera a lo descrito en el Capítulo II sección 6.3.3.1., y las lesiones se clasificaron de igual manera a lo detallado en dicha sección.

Como resultados, después de dos días post-inoculación (dpi), el 81% de los frutos controles y el 48% de los frutos tratados con 1-MCP mostraron micelio inicial en la zona de inoculación (**Figura 48.A**). Luego de 4 dpi, mientras que el 17% de los frutos controles mostró micelio en la zona de inoculación, 45% lesión incipiente más allá de la zona de inoculación y micelio, 29% de lesión moderada + micelio, y el 5% síntomas de putrefacción, los porcentajes en los frutos tratados con 1-MCP con los mismos tipos de lesiones fueron 29%, 59%, 12%, respectivamente y no se observaron frutos con síntomas de putrefacción (**Figura 48.B**). A los

6 dpi, el 5%, 14%, 67% y 10% de los frutos controles exhibieron micelio en la zona inoculada, lesión incipiente más allá de la zona inoculada + micelio, lesión moderada más allá de la de la zona inoculada + micelio y síntomas de putrefacción, respectivamente, mientras que los porcentajes para los frutos tratados con 1-MCP fueron 12, 24, 60% y notablemente, al igual que lo observado para el día 4 dpi, tampoco se registraron frutos tratados con síntomas de putrefacción (**Figura 48.C**).

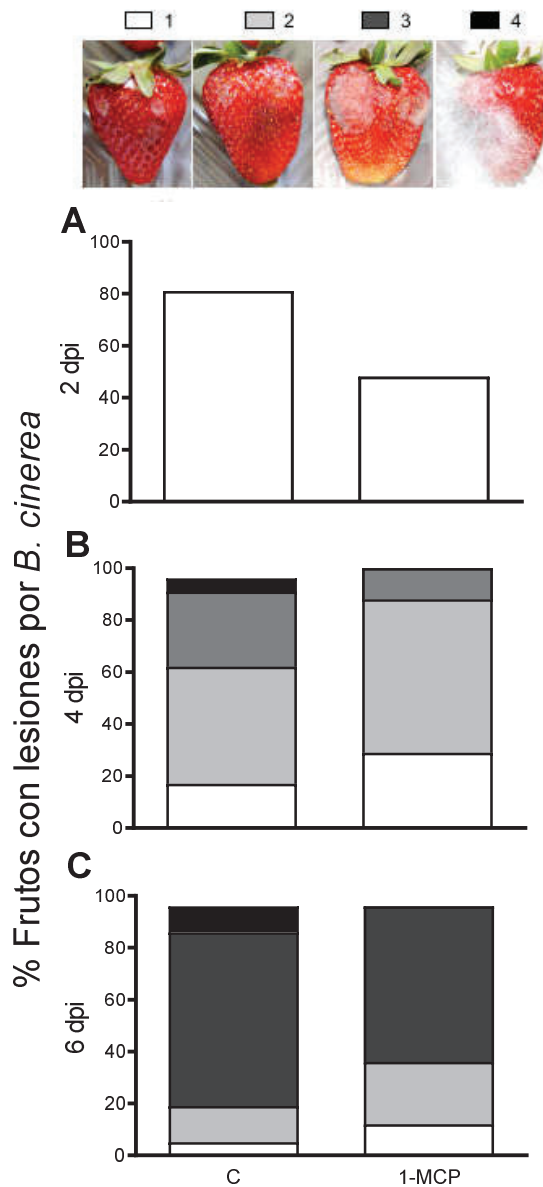


Figura 48. Susceptibilidad a la infección por *B. cinerea* después de 2, 4 y 6 días post-inoculación (dpi) (A, B y C, respectivamente) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP). Los diferentes grados de daño fueron clasificados como: micelio en la zona de inoculación (1, barra blanca); lesión incipiente más allá de la zona de inoculación + micelio (2, barra gris claro); lesión moderada más allá de la zona de inoculación + micelio (3, barra gris oscuro), y síntomas de putrefacción (4, barra negra).

7.3.3.2. Actividades PAL, POD, PPO, quitinasa y β -1,3-glucanasa totales

Inmediatamente después de los tratamientos (0d), no se observaron diferencias significativas de la actividad fenilalanina amonio liasa total entre frutos controles y tratados, no obstante, luego del almacenamiento refrigerado + estantería (10+2d), la actividad PAL disminuyó para ambos grupos y fue aún menor en el grupo de frutos tratados con 1-MCP

(Figura 49.A) correspondiéndose con el menor contenido de antocianinas observado para ese mismo grupo de frutos (Figura 38.B).

La actividad polifenoloxidasa fue mayor en el grupo de frutos tratados con 1-MCP, tanto a 0d como a 10+2d (Figura 49.B). Asimismo, el tratamiento con 1-MCP también incrementó la actividad POD a 0d (Figura 49.C).

La actividad quitinasa no sufrió modificaciones por el tratamiento con 1-MCP a 0d, aunque, luego de 10+2d, esta actividad aumentó en controles y fue significativamente mayor comparado con el grupo de frutos tratados (Figura 49.D).

Finalmente, se observó un incremento de la actividad β -1,3-glucanasa total en frutos tratados respecto a controles, a 0d (Figura 49.E). Luego de 10+2d, la actividad enzimática aumentó en controles y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de frutos.

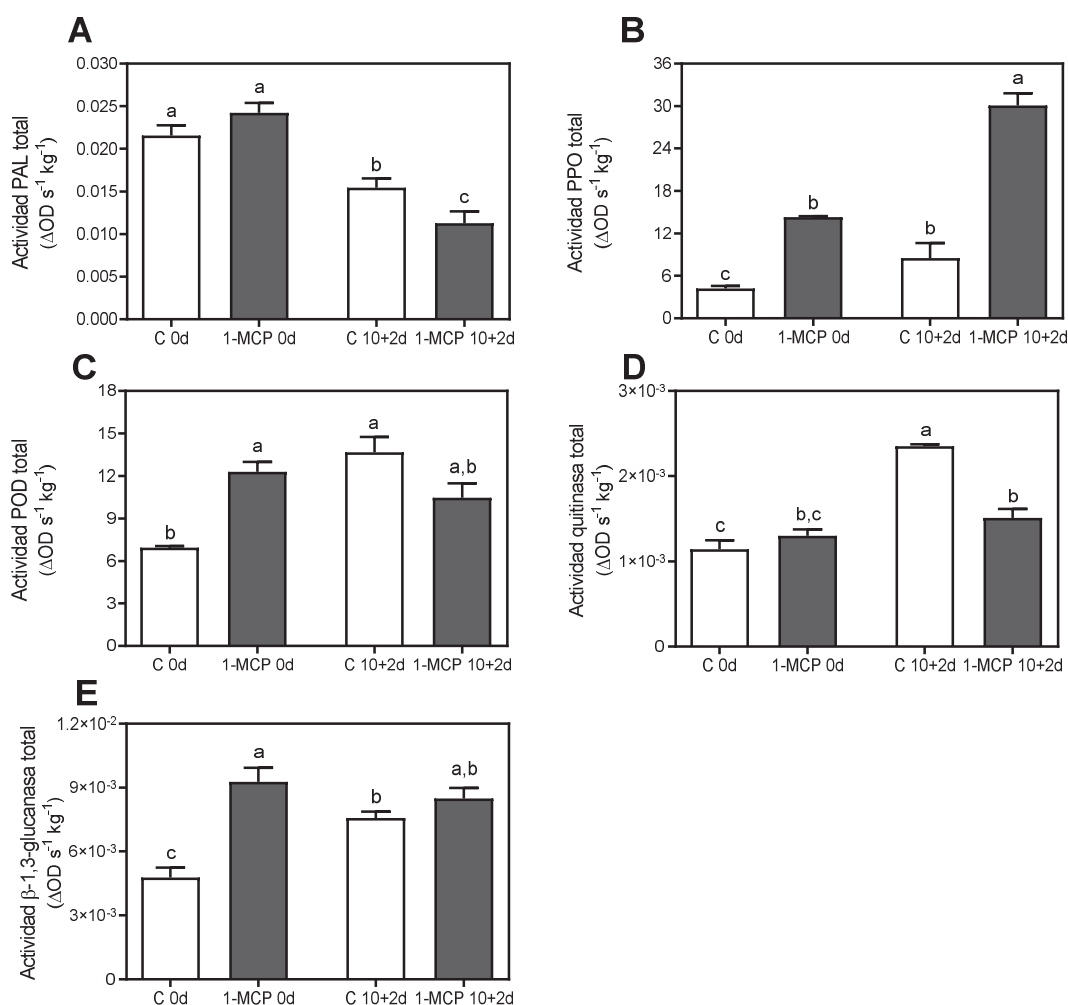


Figura 49. Actividades totales PAL (A), PPO (B), POD (C), Quitinasa (D) y β -1,3-glucanasa (E) en frutos control (C) y tratados con 1-MCP (1-MCP), a 0d y 10+2d. Las barras representan la media \pm error estándar de la media de tres réplicas. Los resultados se analizaron mediante One-way ANOVA y Tukey como post-test. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a $P < 0,05$.

7.4. Discusión

Considerando el efecto del tratamiento con 1-MCP sobre los parámetros de calidad, Jiang y col. (2001) informaron que frutillas (cultivar Everest) 90% rojas, tratadas con diversas concentraciones de 1-MCP (0-1000 nl l^{-1}) y mantenidas a 20 °C, exhibieron un menor aumento del contenido de antocianinas y fueron más firmes que los frutos controles. Sin embargo, los autores sugirieron que la descomposición del fruto se aceleró cuando se trató con concentraciones altas de 1-MCP (500 y 1000 nl l^{-1}). Silva y col. (2012) reportaron que el tratamiento con 1-MCP 100 nl l^{-1} retrasó el ablandamiento de frutillas maduras del cultivar Oso Grande. Chaiprasart (2016) informó que frutillas maduras (cultivar Parajchatan#72) tratadas con 1-MCP 1,0 $\mu\text{l l}^{-1}$ fueron significativamente más firmes que los controles después de 12 días a 5 °C. En el presente trabajo de Tesis, el tratamiento con 1-MCP 1,0 $\mu\text{l l}^{-1}$ mostró ser efectivo para retrasar la pérdida de firmeza de frutillas maduras del cultivar Aroma después 10 días a 4 °C + 2 días a 20 °C. El tratamiento con 1-MCP disminuyó la actividad PAL total y retrasó la acumulación de antocianinas durante el almacenamiento, lo cual se observó también en frutillas del cultivar Toyonoka cosechadas en estadio blanco y tratadas con la misma concentración de 1-MCP (Villarreal y col., 2010). La correlación entre el menor contenido de antocianinas y una disminución de la actividad PAL total en frutos tratados con 1-MCP se reportó también para frutillas rojas (Jiang y col., 2001).

Si bien el tratamiento con 1-MCP retrasó el proceso de ablandamiento durante el almacenamiento, no se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido de pared celular total entre controles y tratados a 10+2d. Sin embargo, cuando se utilizaron paredes celulares aisladas de frutos controles y tratados con 1-MCP en el ensayo de crecimiento *in vitro* de *Botrytis* como única fuente de carbono, se evidenció un menor crecimiento radial del patógeno en las placas correspondientes a frutos tratados, en comparación con los controles. Resultados similares se reportaron para frutillas del cultivar Tonoyoka cosechadas en estadio blanco (Villarreal et al., 2016).

Como se mencionó en la Sección 2.3, la pared celular actúa como una barrera preformada contra microorganismos invasores durante la maduración, y el desensamblaje de esta estructura está íntimamente vinculado con el ataque patogénico (Guidarelli y col., 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis sugieren que las paredes celulares de frutillas tratadas con 1-MCP estarían más íntegras y serían más resistentes al acceso de enzimas hidrolíticas de *Botrytis*. Para evaluar esta idea, se realizaron más investigaciones sobre el efecto de la aplicación de 1-MCP sobre el contenido de polisacáridos de la pared celular y su metabolismo. En este sentido, se observó que frutos tratados con 1-MCP presentaron un mayor contenido de pectinas totales comparado con controles, lo cual concuerda con los resultados reportados por Silva y col. (2012) para el cultivar Oso Grande. Como **primer reporte** en frutillas tratadas con 1-MCP, en el presente trabajo de Tesis, se observó una correspondencia entre el mayor contenido de pectinas totales y de pectinas unidas por interacciones iónicas, respecto a frutillas controles.

Frutillas del cultivar Toyonoka, cosechadas en estadio blanco y tratadas con 1-MCP mostraron un incremento de la expresión *FaPME1* y una reducción en los niveles de expresión de *FaPG1*, mientras que no presentaron cambios en la expresión de *FaPLA* (Villarreal y col., 2016). Balogh y col. (2005) reportaron una regulación negativa de la expresión *FaPLB* en frutillas maduras después de un tratamiento con 1-MCP. De acuerdo a nuestro conocimiento, la presente Tesis doctoral constituye **el primer reporte en frutilla**, que muestra que el tratamiento con 1-MCP disminuyó el grado de esterificación de pectinas totales a través de la regulación positiva de la expresión *FaPME1* y el aumento de la actividad PME. Más aún, la actividad PG total y la expresión del gene *FaPG1* fue significativamente menor en el grupo de frutillas tratadas con 1-MCP a 0d. Adicionalmente, la regulación negativa por el tratamiento con 1-MCP de un gen clave vinculado con la firmeza de frutilla como *FaPLC* (Jiménez-Bermúdez et al., 2002), se **reporta por primera vez** en frutillas cosechadas en estadios de madurez comercial.

Como se mencionó en la sección 2.2.3, el interés particular en los genes *FaPG1* y *FaPLC* se basa en los estudios funcionales que evidenciaron que el silenciamiento de *PLC* o *PG1* en frutillas transgénicas aumenta la longitud de las cadenas de pectinas, lo que genera una estructura poliurónida más compleja (Posé y col., 2015). Además, las frutillas provenientes de las plantas antisentido fueron más firmes que las de tipo salvaje e incrementaron su tiempo de almacenamiento postcosecha (Posé y col., 2015).

Paniagua y col., (2016) sugirieron que una reducción de la pérdida de los residuos de galactosa de cadenas laterales de los polímeros constituyentes de la pared celular de frutilla podría reducir la porosidad de esta estructura y, por lo tanto, el acceso de otras proteínas que degradan pared celular, tales como PGs o PLs, lo que, finalmente conduce a la pérdida de

firmeza. En el presente trabajo se observó que, el tratamiento con 1-MCP disminuyó significativamente tanto la actividad β -galactosidasa como la actividad α -arabinofuranosidasa.

En frutilla, el efecto del tratamiento con 1-MCP en el nivel de expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular, mostró ser dependiente del estadio de madurez del fruto (Balogh y col., 2005). En este sentido, el tratamiento con 1-MCP redujo el contenido de hemicelulosas en frutillas cosechadas en estadio blanco respecto a los controles (Villarreal y col., 2016). Este resultado se correlaciona con una mayor actividad endo-1,4- β -glucanasa y β -xilosidasa, así una regulación positiva de la expresión *FaXyl1* en frutos blancos (Villarreal y col., 2010; Villarreal y col., 2016). Notablemente, en el presente trabajo de Tesis se observó que en frutos maduros tratados con 1-MCP, la cantidad de esta fracción de pared celular fue significativamente mayor que la de frutos controles, de manera congruente con la inhibición de la actividad total de β -Xil. Además, se observó un aumento de la expresión de *FaXTH1* y una disminución de la de *FaXTH2* en los frutos tratados con 1-MCP. De esta manera, similarmente a lo observado para los tratamientos térmico y con CaCl_2 , es posible que, en frutillas maduras, la disminución de la actividad β -Xil y de la expresión *FaXTH2*, en adición con el aumento de la expresión *FaXTH1*, por el tratamiento con 1-MCP podría disminuir la degradación de la fracción hemicelulósica, preservando la malla que este polímero conforma en la pared celular. Además, dado que las α -arabinofuranosidasas pueden liberar residuos de arabinosa terminales tanto de pectinas como de hemicelulosas, la inhibición de la actividad de α -ara en el grupo 1-MCP también podría estar contribuyendo a retrasar la degradación de las hemicelulosas durante el almacenamiento.

En el presente trabajo, se observó que las alturas de las paredes celulares hidratadas de frutos tratados y controles a 0d fueron semejantes a aquellas de frutos tratados después del almacenamiento (10+2d). Dichas alturas fueron similares a su vez a aquellas observadas para frutos en estadios 80%R, mientras que las paredes celulares hidratadas pertenecientes al grupo control a 10+2d exhibieron una disminución notable de la hidratación y alcanzaron el nivel observado para frutos sobremaduros. De acuerdo a lo expresado en la sección 2.2.4.3. la menor hidratación *in vitro* de la paredes celulares en estadios sobremaduros, se correspondería con el colapso de la estructura microfibrilar (Redgwell y col., 1997b). En este sentido, en el grupo de frutos tratados con 1-MCP, la mayor expresión de *FaXTH1* y así como la menor expresión de *FaXTH2*, junto con una inhibición en la actividad β -Xil se correlacionaron con la prevención del colapso de la red celulosa-hemicelulosa.

Respecto a la influencia del tratamiento con 1-MCP en la activación de respuestas de defensa en frutos carnosos, se reportó la inducción de la resistencia a la aparición de

podredumbres para el fruto no climatérico de jujuba (*Zizyphus jujuba*) cuando se lo trató con 1-MCP en concentración $1,0 \mu\text{l l}^{-1}$ (Zhang y col., 2012). Se observó que los frutos tratados retuvieron la firmeza y limitaron el desarrollo del diámetro de las lesiones causadas por el hongo *Penicillium expansum*. Los autores reportaron que los frutos tratados presentaron mayores actividades totales de las enzimas PAL y PPO, entre otras vinculadas con mecanismos de defensa (Zhang y col., 2012). Estudios recientes informaron que la exposición de frutos de caqui (*Diospyros kaki*) al 1-MCP disminuyó el decaimiento de los frutos mediante el aumento de mecanismos de resistencia (Zeng y col., 2021). Los autores reportaron que el tratamiento postcosecha con 1-MCP aumentó significativamente las actividades fenilalanina amonio liasa, polifenol oxidasa, peroxidasa, quitinasa y β -1,3-glucanasa.

En el presente trabajo de Tesis, se observó un menor porcentaje de frutos tratados con 1-MCP con lesiones graves generadas por *B. cinerea*. Estos resultados podrían estar relacionados con una mayor integridad de la pared celular de los frutos tratados, así como con la activación de respuesta de defensa. En este sentido, se reporta por primera vez que el tratamiento con 1-MCP es capaz de activar de respuestas clásicas de defensa en frutillas cosechadas en estadios de madurez comercial, detectándose un aumento en las actividades PPO, POD y β -1,3-glucanasa en frutos tratados.

7.5. Conclusiones

El presente trabajo sugiere que el tratamiento con 1-MCP preserva la pared celular de frutillas maduras, a través del incremento del contenido de las fracciones de pectinas unidas por interacciones iónicas y de hemicelulosas. El aumento de la actividad PME y expresión *FaPME1*, así como la disminución de las expresiones correspondientes a enzimas de degradación (tales como liasas e hidrolasas), ayudaría a mantener la estructura péctica durante el almacenamiento del fruto. Asimismo, el tratamiento con 1-MCP pareció retrasar la solubilidad de pectinas y el colapso de la red celulosa-hemicelulosa durante el almacenamiento. La incidencia de estos cambios estaría íntimamente relacionados a la retención de la firmeza en las frutillas tratadas con 1-MCP, respecto a los controles. Asimismo, el menor desarrollo de lesiones severas causadas por el crecimiento de *Botrytis cinerea* en frutos tratados con 1-MCP respecto a los controles, estaría vinculado al incremento de las actividades de enzimas involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y de hidrólisis de componentes de paredes celulares fúngicas, lo que sugiere que el 1-MCP tiene un efecto potencial en el mantenimiento de la calidad extendiendo la vida postcosecha de los frutos de frutilla.

8. CONCLUSIÓN GENERAL

El presente Trabajo de Tesis doctoral contribuyó a la profundización del conocimiento de las bases bioquímicas y moleculares que determinan la efectividad de tres tratamientos postcosecha en la preservación de la calidad de un fruto de textura delicada y de importancia económica mundial y local como la frutilla.

De esta manera, en los capítulos I, II y III se analizó el efecto de los tratamientos térmico, CaCl_2 y 1-MCP sobre los principales componentes de la pared celular primaria y lámina media y la actividad enzimática y expresión de genes vinculados a su metabolismo.

Como un aporte central, se informa por primera vez una fuerte correlación entre el aumento significativo de la actividad PME endógena junto con la expresión *FaPME1* y la disminución en la actividad PG y expresión *FaPG1* y *FaPLC*, con el retraso del ablandamiento postcosecha observado en frutos tratados.

Se reportó además el efecto de cada uno de los tratamientos en genes relevantes en el metabolismo de cadenas laterales y de hemicelulosas y su efecto en la hidratación *in vitro* de las paredes celulares.

Asimismo, se observó que los frutos tratados térmicamente, con CaCl_2 y con 1-MCP incrementaron las actividades de enzimas asociadas con respuestas de defensa (POD, PPO, quitinasa y β -1,3-glucanasa) y, para los tratamientos térmico y con CaCl_2 , se informó por primera vez su efecto en genes asociados a esta respuesta.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo, refuerzan la idea del rol relevante de las pectin metilesterasas no solo como punto de control en la regulación del metabolismo de la pared celular de frutilla, sino en la inducción de respuestas de defensa de estos frutos.

9. REFERENCIAS

- Aborisade**, A.T., & Ojo, F.H. (2002). Effect of postharvest hot air treatment of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) on storage life and decay caused by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109(6), 639-645.
- Afrin**, S., Gasparriani, M., Forbes, T., Reboredo-Rodríguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giamperi, F. & Battino, M. (2016). Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(22), 4435-4449. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00857
- Aharoni**, A., & O'Connell, A.P. (2002). Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2073–2087. doi: 10.1093/jxb/erf026
- Akhtar**, A., Abbasi, N., & Hussain, A. (2010). Effect of calcium chloride treatments on quality characteristics of loquat fruit during storage. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 181-188.
- Akter**, M., Sarker, M., Choudhury, S., Islam, N., & Uddain, J. (2020). Effect of postharvest treatments on shelf life and quality of litchi stored at ambient temperature. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 7, 319-334. doi: 10.1504/IJPTI.2020.10032955
- Albenne**, C., Canut, H., Hoffmann, L., & Jamet, E. (2014). Plant Cell Wall Proteins: A Large Body of Data, but What about Runaways? *Proteomes*, 2(2), 224–242. doi: 10.3390/proteomes2020224
- Ali**, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213, 29–37. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.008
- Almagro**, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M.A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377–390. doi: 10.1093/jxb/ern277
- Almeida**, J., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., Vos, C. H. R. de, Deiml, B., Mourgues, F., Perrotta, G., Fischer, T. C., Bovy, A. G., Martens, S. & Rosati, C. (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(1), 61–71. doi: 10.1016/j.abb.2007.04.040

- Alvarado-Cepeda, Y.A.,** Mendoza-Villareal, R., Sandoval-Rangel, A., Vega Chávez, J.L., & Franco Gaytán, I. (2020). Physicochemical and sensory quality of strawberries fruits obtained in two cultivation systems. *RIIIT. Rev. int. investig. innov. tecnol.* 8(43), 18-29.
- Amil Ruiz, F.,** Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., & Caballero, J. (2011). The Strawberry Plant Defense Mechanism: A Molecular Review. *Plant & cell physiology*, 52, 1873–1903. doi: 10.1093/pcp/pcr136
- AOAC.** 1990. Association of Official Analytical Chemistries. Official Methods of Analysis. 15th ed. Vol II., Washington, D.C. 918-919.
- Asghari, M., & Hasanlooe, A.R.** (2016). Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and Total Antioxidant content in harvested “Sabrosa” strawberry fruit. *Food Science & Nutrition*, 4(3), 377–383. doi: 10.1002/fsn3.300
- Atkinson, R.,** Johnston, S., Yauk, Y. K., Sharma, N., & Schroeder, R. (2009). Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 149–157. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.06.014
- Ayala-Zavala, J.F.,** Wang, S.Y., Wang, C.Y., & González-Aguilar, G.A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 687–695. doi: 10.1016/j.lwt.2004.03.002
- Ayvaz Sönmez, D.,** Ürün, I., Alagöz, D., Attar, Ş. H., Doğu, Z., Yeşil, B., Wozniak, A., Labudda, M., Zydlik, Z., Zydlik, P., Rutkowski, K., Kesy, J., Jeandet, P., Morkunas, S., Kafkas, S. & Kafkas, N. E. (2021). Phenylalanine ammonialyase and invertase activities in strawberry fruit during ripening progress. *Acta Horticulturae*, (1309), 947–954. doi: 10.17660/ActaHortic.2021.1309.135
- Azam, M.,** Ejaz, S., Rehman, R.N.U., Khan, M., & Qadri, R. (2019). Postharvest Quality Management of Strawberries. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.82341
- Balasubramanian, V.,** Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, 34(11), 1983–1990. doi: 10.1007/s10529-012-1012-6
- Balogh, A.,** Koncz, T., Tisza, V., Kiss, E., & Heszky, L. (2005). The Effect of 1-MCP on the Expression of Several Ripening-related Genes in Strawberries. *HortScience*, 40(7), 2088-2090. doi: 10.21273/HORTSCI.40.7.2088
- Belge, B.,** Goulao, L. F., Comabella, E., Graell i Sarle, J., & Lara Ayala, I. (2017). Refrigerated storage and calcium dips of ripe «Celeste» sweet cherryfruit: Combined effects on cell wall metabolism. *Scientia Horticulturae*, 219, 182-190. doi: 10.1016/j.scienta.2017.02.039

- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014).** Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 228. doi: 10.3389/fpls.2014.00228
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L., & Muñoz-Blanco, J. (2003).** Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany*, *54*(383), 633–645. doi: 10.1093/jxb/erg065
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973).** New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, *54*, 484-489. doi : 10.1016/0003-2697(73)90377-1
- Bombarely, A., Merchante, C., Csukasi, F., Cruz-Rus, E., Caballero, J.L., Medina-Escobar, N., Blanco-Portales, R., Botella, M.A., Muñoz Blanco, J., Sánchez-Sevilla, J.F. & Valpuesta, V. (2010).** Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC Genomics*, *11*(1), 503. doi: 10.1186/1471-2164-11-503
- Broxterman, S.E. (2018).** The architecture of the primary plant cell wall: The role of pectin reconsidered. Thesis, Wageningen University. doi: 10.18174/451289
- Brummell, D.A., & Harpster, M.H. (2001).** Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, *47*(1–2), 311–340. doi: 10.1023/A:1010656104304
- Brummell, D.A. (2006).** Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, *33*(2), 103–119. doi: 10.1071/FP05234
- Bustamante, C.A., Rosli, H.G., Añón, M.C., Civello, P.M., & Martínez, G.A. (2006).** β -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Science*, *171*(4), 497–504.
- Bustamante, C., Civello, P., & Martínez, G. (2009).** Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXylI*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXylI* in strawberry fruit. *Plant Science*, *177*(1), 49–56. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.03.015
- Bustamante, C.A., Budde C.O., Borsani J., Lombardo V.A., Lauxmann M.A., Andreo C.S., Lara M.V. y Drincovich M.F. (2012).** Heat treatment of peach fruit: modifications in the extracellular compartment and identification of novel extracellular proteins. *Plant Physiol. Biochem.* *60*, 35-45.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., & Powell, A.L.T. (2008).** The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility

to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 859-864. doi: 10.1073/pnas.0709813105

Casado-Díaz, A., Encinas-Villarejo, S., Santos, B. de los, Schilirò, E., Yubero-Serrano, E.M., Amil-Ruíz, F., Pocovi, M.I., Pliego-Alfaro, F., Dorado, G., Rey, M., Romero, F., Muñoz Blanco, J. & Caballero, J.L. (2006). Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum*, 128(4), 633–650. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00798.x

Castillejo, C., de la Fuente, J.I., Iannetta, P., Botella, M.A., & Valpuesta, V. (2004). Pectin esterase gene family in strawberry fruit: Study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 909–918. doi: 10.1093/jxb/erh102

Castro, R.I., González-Feliu, A., Muñoz-Vera, M., Valenzuela-Riffo, F., Parra-Palma, C., & Morales-Quintana, L. (2021). Effect of Exogenous Auxin Treatment on Cell Wall Polymers of Strawberry Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6294. doi: 10.3390/ijms22126294

Chaiprasart, P. (2016). Effect of 1-methylcyclopropene on postharvest qualities of ‘Parajchatan #72’ strawberry fruit. *Acta Horticulturae*, 1117, 227-230. doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1117.36

Chea, S., Yu, D. J., Park, J., Oh, H. D., Chung, S. W., & Lee, H. (2019). Fruit softening correlates with enzymatic and compositional changes in fruit cell wall during ripening in ‘Bluecrop’ highbush blueberries. *Scientia Horticulturae*, 245, 163–170. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.019

Chen, C., Zhang, H., Dong, C., Ji, H., Zhang, X., Li, L., Ban, Z., Zhang, N. & Xue, W. (2019). Effect of ozone treatment on the phenylpropanoid biosynthesis of postharvest strawberries. *RSC Advances*, 9(44), 25429–25438. doi: 10.1039/C9RA03988K

Chen J., He L., Jiang Y., Wang Y., Joyced D., Ji Z., & Lu W. (2008). Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiologia Plantarum* 132, 318-328. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.01013.x

Chen, J., Mao, L., Lu, W., Ying, T., & Luo, Z. (2016). Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and abscisic acid. *Planta*, 243(1), 183–197. doi: 10.1007/s00425-015-2402-5

Civello, P. M., Martinez, G. A., Chaves, A. R., & Anon, M. C. (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(10), 2596–2601. doi: 10.1021/jf00058a008

- Civello, P.M., Powell, A.L., Sabehat, A., & Bennett, A.B.** (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, *121*(4), 1273–1280. doi: 10.1104/pp.121.4.1273
- Cosgrove, D.J.** (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *13*, 171–201. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.171
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M., Fernie, A. R., Rathjen, J.P., Botella, M.A., Valpuesta, V., & Medina-Escobar, N.** (2011). Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *The New Phytologist*, *191*(2), 376–390. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03700.x
- Daher, F.B., & Braybrook, S.A.** (2015). How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 523. doi: 10.3389/fpls.2015.00523
- D'Amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., & Willemot, C.** (1993). Gamma radiation affects cell wall composition of strawberries. *Journal of Food Science* *58*, 182-185. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb03239.x
- Darley, C.P., Forrester, A.M., & McQueen-Mason, S.J.** (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology*, *47*(1–2), 179–195. doi: 10.1023/A:1010687600670
- Degraeve, P., Saurel, R., Coutel, Y.** (2003). Vacuum Impregnation Pretreatment with Pectinmethylesterase to Improve Firmness of Pasteurized Fruits. *Food Science* *68*(2), 716-721. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05738.x
- De Lorenzo, G. & Ferrari, S.** (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* *5*(4):295-9. s1369-5266(02)00271-6.
- Diallinas, G., & Kanellis, A.K.** (1994). A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: CDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Molecular Biology*, *26*(1), 473–479. doi: 10.1007/BF00039557
- Dixon, R.A., & Paiva, N.L.** (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, *7*(7), 1085–1097. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085
- Dotto, M.C., Martínez, G.A., & Civello, P.M.** (2006). Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*(5–6), 301–307. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.06.008
- Dotto, M.C., Pombo, M.A., Martínez, G.A., & Civello, P.M.** (2011). Heat treatments and expansin gene expression in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*, *130*(4), 775-780. doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.002

- Draye, M., & Van Cutsem, P. (2008).** Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*, *165*(11), 1152–1160. doi: 10.1016/j.jplph.2007.10.006
- Duvetter, T., Fraeye, I., Van Hoang, T., Van Buggenhout, S., Verlent, I., Smout, C., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2005).** Effect of Pectinmethylesterase Infusion Methods and Processing Techniques on Strawberry Firmness. *Journal of Food Science* *70*(6), 383-388. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11460.x
- Eklöf, J.M., & Brumer, H. (2010).** The XTH gene family: An update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiology*, *153*(2), 456–466. doi: 10.1104/pp.110.156844
- Enoki, S., & Suzuki, S. (2016).** Pathogenesis-Related Proteins in Grape. En *Grape and Wine Biotechnology*. IntechOpen. doi: 10.5772/64873
- Estrada-Johnson, E., Csukasi, F., Pizarro, C.M., Vallarino, J.G., Kiryakova, Y., Vioque, A., Brumos, J., Medina-Escobar, N., Botella, M.A., Fernie, A.R., Sánchez-Sevilla, J.F., Osorio, S., & Valpuesta, V. (2017).** Transcriptomic Analysis in Strawberry Fruits Reveals Active Auxin Biosynthesis and Signaling in the Ripe Receptacle. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 889. doi: 10.3389/fpls.2017.00889
- Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016).** Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, *6*(1), 47–63. doi: 10.3233/JBR-150113
- Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., & Heredia, A. (1995).** Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum* *93*(4), 651-658. doi: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb05113.x
- Ferrari, S., Savatin, D., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2013).** Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 49. doi: 10.3389/fpls.2013.00049
- Folta, K.M. (2013).** Functionalizing the Strawberry Genome—A Review. *International Journal of Fruit Science* *13*(1-2), 162-174. doi: 10.1080/15538362.2012.698150
- Fraeye, I., Knockaert, G., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2009).** Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution. *Food Chemistry* *114*(4), 1371-1379. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.041
- Fu, W., Zhang, M., Zhang, P., Liu, Z., Dong, T., Zhang, S., Ren, Y., Jia, H., & Fang, J. (2021).** Transcriptional and metabolite analysis reveal a shift in fruit quality in response to calcium

chloride treatment on «Kyoho» grapevine. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2246-2257. doi: 10.1007/s13197-020-04735-5

Galetto C., Verdini R., Zorrilla S., Rubiolo A. (2010). Freezing of strawberries by immersion in CaCl₂ solutions. *Food Chemistry* 123, 243-248. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2010.04.018

Gall, H.L., Philippe, F., Domon, J.M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4(1), 112–166. doi: 10.3390/plants4010112

Galli, V., Messias, R., Perin, E., Borowski, J., Bamberg, A., & Rombaldi, C. (2016). Mild salt stress improves strawberry fruit quality. *LWT - Food Science and Technology*, 73. doi: 10.1016/j.lwt.2016.07.001

García J., Aguilera C., Albi M., (1995). Postharvest heat treatment on Spanish strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Tudla). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1489-1491 doi: 10.1021/jf00054a014 492.

Ghasemi, S., Ghasemi, M., Nejatian, M. A., & Golmohammadi, M. (2021). Effect of postharvest calcium chloride treatment on the fruit quality and storage life of some Cornelean cherry genotypes (*Cornus mas* L). *Journal of Food Science and Technology*, 18(116), 131-141.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 28(1), 9–19. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.009

Giovannoni, J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16 Suppl, S170-180. doi: 10.1105/tpc.019158

Given, N.K., Venis, M.A., & Grierson, D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174(3), 402–406. doi: 10.1007/BF00959527

Grover, A. (2012). Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 57–73. doi: 10.1080/07352689.2011.616043

Gu, T., Jia, S., Huang, X., Wang, L., Fu, W., Huo, G., Gan, L., Ding, J. & Li, Y. (2019). Transcriptome and hormone analyses provide insights into hormonal regulation in strawberry ripening. *Planta*, 250(1), 145–162. doi: 10.1007/s00425-019-03155-w

Guidarelli, M., Carbone, F., Mourgues, F., Perrotta, G., Rosati, C., Bertolini, P., & Baraldi, E. (2011). *Colletotrichum acutatum* interactions with unripe and ripe strawberry fruits and differential responses at histological and transcriptional levels. *Plant Pathology*, 60(4), 685–697. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02423.x

Hadfield, K.A., & Bennett, A.B. (1998). Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117(2), 337–343. doi: 10.1104/pp.117.2.337

- Han, Y.**, Chen, C., Yan, Z., Li, J., & Wang, Y. (2019). The methyl jasmonate accelerates the strawberry fruits ripening process. *Scientia Horticulturae*, 249, 250–256. doi: 10.1016/j.scienta.2019.01.061
- Harrison, E.**, McQueen-Mason, S., & Manning, K. (2001). Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of experimental botany*, 52, 1437–1446. doi: 10.1093/jexbot/52.360.1437
- Hernández-Muñoz, P.**, Almenar, E., Ocio, M., & Gavara, R. (2006). Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*, 39, 247–253. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.11.006
- Hirsch, M.**, Langer, S.E., Marina, M., Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A., & Villarreal, N.M. (2021). Expression profiling of endo-xylanases during ripening of strawberry cultivars with contrasting softening rates. Influence of postharvest and hormonal treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3676–3684. doi: 10.1002/jsfa.10997
- Hoffmann, T.**, Kalinowski, G., & Schwab, W. (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: A rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 48(5), 818–826. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02913.x
- Iannetta, P.**, Laarhoven, L.J., Medina-Escobar, N., James, E., McManus, M., Davies, H., & Harren, F. (2006). Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, 127(2), 247–259. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00656.x
- Iglesias Méndez, N.** (2008). *Actividades glicosidasas sobre el xiloglucano de la pared celular de Arabidopsis thaliana*. Tesis. Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. Recuperado de <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/2491>
- Irfan, P.K.**, Vanjakshi, V., Prakash, M.N.K., Ravi, R., & Kudachikar, V.B. (2013). Calcium chloride extends the keeping quality of fig fruit (*Ficus carica* L.) during storage and shelf-life. *Postharvest Biology and Technology* 82, 70–75 doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.02.008
- Itai, A.**, Ishihara, K., & Bewley, J.D. (2003). Characterization of expression, and cloning, of beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2615–2622. doi: 10.1093/jxb/erg291
- Jarvis, M.**, Briggs, S.P.H., & Knox, J. (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* 26(7), 977–989. doi: 10.1046/J.1365-3040.2003.01034.X

- Jayasankar**, S., Li, Z., & Gray, D. J. (2003). Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after in vitro selection and its role in anthracnose resistance. *Functional Plant Biology: FPB*, 30(11), 1105–1115. doi: 10.1071/FP03066
- Jia**, H., Zhao, P., Wang, B., Pervaiz, T., Zhao, F., Zhao, M., Wang, Q., Yang, T. & Fang, J. (2016). Overexpression of Polyphenol Oxidase Gene in Strawberry Fruit Delays the Fungus Infection Process. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34, 592–606. doi: 10.1007/s11105-015-0946-y
- Jia**, H.F., Chai, Y.M., Li, C.L., Lu, D., Luo, J.J., Qin, L., & Shen, Y.Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, 157(1), 188–199. doi: 10.1104/pp.111.177311
- Jiang**, Y., & Joyce, D. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 39, 171-174. doi: 10.1023/A:1022539901044
- Jiang**, Y., Joyce, D., & Terry, L. (2001). 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 227-232. doi: 10.1016/S0925-5214(01)00123-5
- Jiménez-Bermúdez**, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J., Lopez Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A. & Mercado, J. (2002). Manipulation of Strawberry Fruit Softening by Antisense Expression of a Pectate Lyase Gene. *Plant physiology*, 128, 751–759. doi: 10.1104/pp.010671
- Jin**, P., Wang, H., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, L., & Zheng, Y. (2017). UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 225, 106–111. doi: 10.1016/j.scienta.2017.06.062
- Jin**, P., Zheng, C., Huang, Y., Wang, X., Luo, Z., & Zheng, Y. (2016). Hot air treatment activates defense responses and induces resistance against *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(11), 2658-2665. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61387-4
- Kader**, A.A. (2011). Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. UCANR Publications.
- Karaaslan**, N.M., & Yaman, M. (2017). Anthocyanin profile of strawberry fruit as affected by extraction conditions. *International journal of food properties*, 20, 2313-2322. doi: 10.1080/10942912.2017.1368548
- Kasprzewska**, A. (2003). Plant Chitinases – Regulation and Function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(3), 809-824. PMID: 12949620.

- Khan, A., & Shih, D.S.** (2004). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant. *Plant Science* 166, 753-762. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2003.11.015
- Khan, A., Shi, Y., & Shih, D.S.** (2003). Cloning and partial characterization of a beta-1,3-glucanase gene from strawberry. *DNA Sequence: The Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 14(6), 406–412. doi: 10.1080/10425170310001608399
- Khan, A.A.** (2002). Characterization of chitinase activities, and cloning, analysis, and expression of genes encoding pathogenesis-related proteins in strawberry. Thesis, *Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College* 155.
- Kirschbaum, D., Vicente, E., Cano-Torres, M.A., Gambardella, M., Veizaga-Pinto, F.K., & Antunes, L.** (2017). Strawberry in South America: From the Caribbean to Patagonia. *Acta Horticulturae* 1156, 947–956. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.140
- Koh, H.T., & Melton, L.D.** (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 23–33. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00003-0
- Kolniak-Ostek, J., Wojdyło, A., Markowski, J., & Siucińska, K.** (2014). 1-Methylcyclopropene postharvest treatment and their effect on apple quality during long-term storage time. *European Food Research and Technology*, 239(4), 603-612. doi: 10.1007/s00217-014-2256-2
- Lara, I., García, P., & Vendrell, M.** (2004). Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 3(34), 331-339. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.05.018
- Lara, I., García, P., & Vendrell, M.** (2006). Post-harvest heat treatments modify cell wall composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 109, 48-53. doi: 10.1016/j.scienta.2006.03.001
- Lara, M.V., Borsani J., Budde C.O., Lauxmann M.A., Andreo C.S. y Drincovich M.F.** (2009) Biochemical and proteomic analysis of “Dixiland” peach fruit (*Prunus persica*) upon air heat treatment. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4315-4333. doi: 10.1093/jxb/erp267
- La Scalia, G., Aiello, G., Miceli, A., Nasca, A., Alfonzo, A., & Settanni, L.** (2015). Effect of Vibration on the Quality of Strawberry Fruits Caused by Simulated Transport. *Journal of Food Process Engineering*, 39(2), 140-156. doi: 10.1111/jfpe.12207
- Lauxmann, M.A., Brun B., Borsani J., Bustamante C.A., Budde C.O., Lara M.V. y Drincovich M.F.** (2012). Transcriptomic profiling during the post-harvest of heat-treated Dixiland *Prunus*

persica fruits: common and distinct response to heat and cold. *PLoSOne* 7(12), e51052. doi: 10.1371/journal.pone.0051052

Lauxmann, M.A., Borsani J., Osorio S., Lombardo V.A., Budde C.O., Bustamante C.A., Monti L., Fernie A.R., Drincovich M.F. y Lara M.V. (2014). Deciphering the metabolic pathways influencing heat and cold responses during post-harvest physiology of peach fruit. *Plant Cell Environ.* 37, 601-616.

Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: Update on function and structure. *Biochimica et biophysica acta*, 1465, 246–262. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00142-5

Leszczuk, A., Kalaitzis, P., Blazakis, K.N., & Zdunek, A. (2020). The role of arabinogalactan proteins (AGPs) in fruit ripening—A review. *Horticulture Research*, 7(1), 1–12. doi: 10.1038/s41438-020-00397-8

Leubner-Metzger G, Meins F Jr (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthu-krishnan S (eds) Pathogenesis-related proteins in plants. CRC, Florida, 49-76.

Li, C., Shen, W., Lu, W., Jiang, Y., Xie, J., & Chen, J. (2009). 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 254–259. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.12.009

Li, L., & Steffens, J.C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239–247. doi: 10.1007/s00425-002-0750-4

Li, S., Bashline, L., Lei, L., & Gu, Y. (2014). Cellulose Synthesis and Its Regulation. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 12, e0169. doi: 10.1199/tab.0169

López, A.P., Gochicoa, M.T.N., & Franco, A.R. (2010). Activities of antioxidant enzymes during strawberry fruit development and ripening. *Biologia Plantarum*, 54(2), 349–352. doi: 10.1007/s10535-010-0061-8

Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14(3), 257-269. doi: 10.1016/S0925-5214(98)00045-3

Lurie, S. & Pedreschi, R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1(1). doi:10.1038/hortres.2014.30

Lv, J., Han, X., Bai, L., Xu, D., Ding, S., Ge, Y., Li, C., & Li, J. (2020). Effects of calcium chloride treatment on softening in red raspberry fruit during low-temperature storage. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13419. doi: 10.1111/jfbc.13419

- Macías-Rodríguez, L., Quero, E., & López, M.G.** (2002). Carbohydrate Differences in Strawberry Crowns and Fruit (*Fragaria x ananassa*) during Plant Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3317–3321. doi: 10.1021/jf011491p
- Mandal, S., & Mitra, A.** (2007). Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *71*(4), 201-209. doi: 10.1016/j.pmpp.2008.02.003
- Manenoi, A., & Paull, R.** (2007). Papaya fruit softening, endoxylanase gene expression, protein and activity. *Physiologia plantarum*, *131*, 470–480. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00967.x
- Manning, K.** (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochemistry* *195*, 45-50. doi: 10.1016/0003-2697(91)90292-2
- Manning, K.** (1993) Soft Fruit. Biochemistry of Fruit Ripening. Edited by G. Seymour, J. Taylor and G. Tucker. Published by Chapman and Hall, London. 347-377.
- Manning, K.** (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, *194*(1), 62–68. Publicado por Springer.
- Martínez, G.A., Chaves, A.R., & Añón, M.C.** (1994). Effect of gibberellic acid on ripening of strawberry fruits (*Fragaria annanassa* Duch.). *Journal of Plant Growth Regulation* *13*, 87. doi: 10.1007/BF00210952
- Martínez, G.A., Chaves, A.R., & Civello, P.M.** (2004). Beta-xylosidase activity and expression of a beta-xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(2), 89–96. doi: 10.1016/j.plaphy.2003.12.001
- Martínez, G., & Civello, P.** (2008). Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* *49*, 38-45. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.01.013
- Massolo, J.F., Concellón, A., Chaves, A.R., & Vicente, A.R.** (2011). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *59*(1), 10-15. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.007
- Mbéguié-A-Mbéguié, D., Hubert, O., Baurens, F.C., Matsumoto, T., Chillet, M., Fils-Lycaon, B., & Sidibé-Bocs, S.** (2009). Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *Journal of Experimental Botany*, *60*(7), 2021–2034. doi: 10.1093/jxb/erp079
- McDonald, R.E., Mccollum, G., Baldwin, E. A.** (1995). Heat Treatments Extend Shelf-life of Tomato Fruit. *Horticultural Science*, *30*(4). doi: 10.21273/HORTSCI.30.4.786D

- Medina-Escobar**, N., Cárdenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L., & Muñoz-Blanco, J. (1997). Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology*, 34(6), 867–877. doi: 10.1023/a:1005847326319
- Mehli**, L., Schaart, J.G., Kjellsen, T.D., Tran, D.H., Salentijn, E.M.J., Schouten, H.J., & Iversen, T.H. (2004). A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry. *The New Phytologist*, 163(1), 99–110. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01088.x
- Mercado**, J., Pliego-Alfaro, F., & Quesada, M. (2011). Fruit Shelf Life and Potential for Its Genetic Improvement. En *Breeding for Fruit Quality*. 81–104. doi: 10.1002/9780470959350.ch4
- Merchante**, C., Vallarino, J.G., Osorio, S., Aragüez, I., Villarreal, N., Ariza, M.T., Martínez, G.A., Medina-Escobar, N., Civello, M.P., Fernie, A.R., Botella, M.A., & Valpuesta, V. (2013). Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of Experimental Botany*, 64(14), 4421–4439. doi: 10.1093/jxb/ert257
- Mezzetti**, B. (2009). GMO Strawberry: Methods, Risk and Benefits. *Genetics and Genomics of Rosaceae* 6, 487-506. doi: 10.1007/978-0-387-77491-6_23
- Miedes**, E., Herbers, K., Sonnewald, U., Lorences, E.P. (2010). Overexpression of a cell wall enzyme reduces xyloglucan depolymerization and softening of transgenic tomato fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58(9): 5708-13. doi: 10.1021/jf100242z
- Miedes**, E., Lorences, E.P. (2009). Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening. *Journal of Plant Physiology* 166(5): 489-98. doi: 10.1016/j.jplph.2008.07.003
- Morales-Delgado**, D.Y., Téllez-Medina, D.I., Rivero-Ramírez, N.L., Arellano-Cárdenas, S., López-Cortez, S., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., Cornejo-Mazón, M. (2014). Effect of convective drying on total anthocyanin content, antioxidant activity and cell morphometric parameters of strawberry parenchymal tissue (*Fragaria x ananassa* Dutch). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 179–187.
- Moreno**, A., Margarit, E., Morales, L., Montecchiarini, M., Bello, F., Vázquez, D., Podestá, F., Tripodi, K.E.J. (2020). Immediate- and long-term proteomic responses of epicarp from two heat conditioned tangor cultivars stored at low temperature differing in their susceptibility to infection. *Postharvest Biology and Technology* 161, 111091

- Moreno, A.S., Perotti, V.E., Margarit, E., Bello, F., Vázquez, D.E., Podestá, F.E., Tripodi, K.E.J.** (2018). Metabolic profiling and quality assessment during the postharvest of two tangor varieties subjected to heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 142,10-18
- Moya-León, M.A., Mattus-Araya, E., & Herrera, R.** (2019). Molecular Events Occurring During Softening of Strawberry Fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 615. doi: 10.3389/fpls.2019.00615
- Mpai, S., & Sivakumar, D.** (2020). Stimulation of Light-Emitting Diode Treatment on Defence System and Changes in Mesocarp Metabolites of Avocados Cultivars (Hass and Fuerte) during Simulated Market Shelf Conditions. *Agronomy*, 10, 1654. doi: 10.3390/agronomy10111654
- Mukkun, L., & Singh, Z.** (2009). Methyl jasmonate plays a role in fruit ripening of “Pajaro” strawberry through stimulation of ethylene biosynthesis. *Scientia Horticulturae*, 123(1), 5–10. doi: 10.1016/j.scienta.2009.07.006
- Muñoz, C., Sanchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Hoffmann T., Schwab W., Valpuesta V.** 2011. Polyphenol composition in the ripe fruits of *Fragaria* species and transcriptional analyses of key genes in the pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(23), 12598-1260
- Nagpala, E.G., Guidarelli, M., Gasperotti, M., Masuero, D., Bertolini, P., Vrhovsek, U., & Baraldi, E.** (2016). Polyphenols Variation in Fruits of the Susceptible Strawberry Cultivar Alba during Ripening and upon Fungal Pathogen Interaction and Possible Involvement in Unripe Fruit Tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(9), 1869–1878. doi: 10.1021/acs.jafc.5b06005
- Nardi C.F.** (2014). Caracterización del módulo de unión a carbohidratos del gen de expansina *FaEXP2* de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) y análisis de la región promotora. Tesis. *Universidad Nacional de San Martín*.
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Opazo, M.C., Martínez, G.A., Moya-León, M.A., & Civello, P.M.** (2014). Expression of *FaXTH1* and *FaXTH2* genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. *Scientia Horticulturae*, 165, 111–122. doi: 10.1016/j.scienta.2013.10.035
- Nardi, C., Villarreal, N., Dotto, M.C., Ariza, M.T., Vallarino, J.G., Martínez, G., Valpuesta V., Civello, P.** (2016). Influence of plant growth regulators on Expansin2 expression in strawberry fruit. Cloning and functional analysis of *FaEXP2* promoter region. *Postharvest Biology and Technology* 114, 17-28. doi: 10.1016/J.POSTHARVBIO.2015.11.008
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V.J., & Kareem, A.** (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1298. doi: 10.3389/fmicb.2020.01298

- Nunes**, M.C. do N. (2008). Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables. Ames, Iowa: Blackwell Pub. doi:10.1002/9780813802947
- Oosumi**, T., Gruszewski, H.A., Blischak, L.A., Baxter, A.J., Wadl, P.A., Shuman, J.L., Veilleux, R.E. & Shulaev, V. (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223(6), 1219–1230. doi: 10.1007/s00425-005-0170-3
- Osorio**, S., Bombarely, A., Giavalisco, P., Usadel, B., Stephens, C., Aragüez, I., Medina-Escobar, N., Botella, M.A., Fernie, A.R., & Valpuesta, V. (2011). Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defence and development of the fruit. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2855–2873. doi: 10.1093/jxb/erq465
- Osorio**, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G.J., Suau, R., Heredia A., Botella M.A. & Valpuesta, V. (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(1), 43–55. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03398.x
- Oviedo**, N., Villarreal, N., Civello, P., & Martínez, G. (2013). Efecto del tratamiento físico y químico combinado (Térmico/CaCl₂) en parámetros de calidad postcosecha de frutilla (*Fragaria x ananassa*, Duch). Trabajo Completo publicado en el CD del XIV Congreso de Cytal - Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología, Rosario.
- Paliyath**, G., Murr, D.P., Handa, A.K., & Lurie, S. (2009). *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers*. John Wiley & Sons.
- Pan**, J., Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R., & Civello, P.M. (2004). Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1831–1838. doi: 10.1002/jsfa.1894
- Paniagua**, C., Blanco-Portales, R., Barceló-Muñoz, M., García-Gago, J.A., Waldron, K.W., Quesada, M.A., Muñoz-Blanco J. & Mercado, J.A. (2016). Antisense down-regulation of the strawberry β -galactosidase gene *Fa β Gal4* increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 619–631. doi: 10.1093/jxb/erv462
- Paniagua**, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A., & Mercado, J.A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, 114(6), 1375–1383. doi: 10.1093/aob/mcu149

- Paniagua**, C., Santiago-Doménech, N., Kirby, A.R., Gunning, A.P., Morris, V.J., Quesada, M.A., Matas, A.J., & Mercado, J.A. (2017). Structural changes in cell wall pectins during strawberry fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* 118, 55-63. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.06.001
- Paul**, V., Pandey, R., & Srivastava, G.C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview. *Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 1–21. doi: 10.1007/s13197-011-0293-4
- Payasi**, A., Mishra, N.N., Chaves, A.L.S., & Singh, R. (2009). Biochemistry of fruit softening: An overview. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 15(2), 103–113. doi: 10.1007/s12298-009-0012-z
- Peng**, Z., & Jin, Y. (2020). Purification, Identification, and Characterization of an Endo-1,4- β -Xylanase from Wheat Malt. *Molecules*, 25(7), 1572. doi: 10.3390/molecules25071572
- Perkins-Veazie**, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural reviews*, 17, 267–297. doi:10.1002/9780470650585.ch8
- Pfaffl** M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic acids research* 29, 45-45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pombo**, M.A. (2009). Irradiación de frutillas con UV-C: efecto sobre la síntesis de proteínas, degradación de la pared celular y mecanismos de defensa. Tesis. *Universidad Nacional de General San Martín*.
- Pombo**, M.A., Dotto, M.M., Martínez, G.A., Civello, P.M. (2009). UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biology and Technology* 51 141-148. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.007
- Pombo**, M.A., Martínez, G.A., & Civello, P.M. (2011b). Cloning of *FaPAL6* gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 181(2), 111–118. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.012
- Pombo**, M.A., Rosli, H.G., Martínez, G.A., & Civello, P.M. (2011a). UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 59(1), 94–102. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.08.003
- Posé**, S., García-Gago, J.N., Santiago-Doménech, F., Pliego-Alfaro, F., Quesada M.A. & Mercado, J. (2011). Strawberry Fruit Softening: Role of Cell Wall Disassembly and its Manipulation in Transgenic Plants. *Genes, Genomes and Genomics* 5(S1), 40-48.

- Posé, S., Kirby, A.R., Paniagua, C., Waldron, K.W., Morris, V.J., Quesada, M.A., & Mercado, J.A. (2015).** The nanostructural characterization of strawberry pectins in pectate lyase or polygalacturonase silenced fruits elucidates their role in softening. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 134–145. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.018
- Posé, S., Paniagua, C., Matas Arroyo, A., Gunning, A., Morris, V., Quesada, M., & Mercado, J. (2018).** A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. *Trends in Food Science & Technology*, *87*, 47–58. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.011
- Prasanna, V., Prabha, T., & Tharanathan, R. (2007).** Fruit Ripening Phenomena—An Overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, *47*, 1–19. doi: 10.1080/10408390600976841
- Prasannath, K. (2017).** Plant defense-related enzymes against pathogens: A review. *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, *11*, 38. doi: 10.4038/agrieast.v11i1.33
- Puhl, I., & Treutter, D. (2008).** Ontogenetic variation of catechin biosynthesis as basis for infection and quiescence of *Botrytis cinerea* in developing strawberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *115*(6), 247–251. doi: 10.1007/BF03356272
- Quesada, M., Blanco-Portales, R., Posé, S., García-Gago, J., Jiménez-Bermúdez, S., Muñoz-Serrano, A., Caballero J.L., Pliego-Alfaro F., Mercado, J.A. & Muñoz-Blanco, J. (2009).** Antisense Down-Regulation of the FaPG1 Gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening. *Plant physiology*, *150*, 1022–1032. doi: 10.1104/pp.109.138297
- Redgwell, R.J., Fischer, M., Kendal, E., & MacRae, E.A. (1997b).** Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, *203*(2), 174–181. doi: 10.1007/s004250050179
- Redgwell, R.J., MacRae, E., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., & Harker, R. (1997a).** In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta*, *203*(2), 162–173. doi: 10.1007/s004250050178
- Reis, L., Forney, C.F., Jordan, M., Munro Pennell, K., Fillmore, S., Schemberger, M.O., & Ayub, R.A. (2020).** Metabolic Profile of Strawberry Fruit Ripened on the Plant Following Treatment With an Ethylene Elicitor or Inhibitor. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 995. doi: 10.3389/fpls.2020.00995
- Rienth, M., Torregrosa, L., Luchaire, N., Chatbanyong, R., Lecourieux, D., Kelly, M.T., & Romieu, C. (2014).** Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 108. doi: 10.1186/1471-2229-14-108

- Rohman**, A., Dijkstra, B.W., & Puspaningsih, N.N.T. (2019). β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5524. doi: 10.3390/ijms20225524
- Ronen**, R., Zauberman, G., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I., & Fuchs, Y. (1991). Xylanase and Xylosidase Activities in Avocado Fruit. *Plant Physiology*, 95(3), 961–964. doi: 10.1104/pp.95.3.961
- Rosli**, H.G., Civello, P.M., & Martínez, G.A. (2009). Alpha-l-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), 272–281. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.12.009
- Rosli**, H.M., Civello, P.M., & Martínez, G.A. (2004). Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(10), 823–831. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.10.002
- Sampedro**, J., & Cosgrove, D.J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 242. doi: 10.1186/gb-2005-6-12-242
- Sanchez-Ballesta**, M., Zacarias, L., Granell, A., & Lafuente, M. (2000). Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(7), 2726–2731. doi: 10.1021/jf991141r
- Santiago-Doménech**, N., Jiménez-Bemúdez, S., Matas, A.J., Rose, J.K.C., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J.A., & Quesada, M.A. (2008). Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 59(10), 2769–2779. doi: 10.1093/jxb/ern142
- Schaart**, J.G., Mehli, L., & Schouten, H.J. (2005). Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using Pyrosequencing™: Quantification of allele-specific gene expression. *The Plant Journal*, 41(3), 493–500. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02299.x
- Sels**, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., & De Bolle, M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 46(11), 941–950. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011
- SENASA**. (2005). Frutillas frescas y congeladas. Resolución-866-2012-SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Recuperado el 3 de septiembre de 2021, de SENASA website: <http://www.senasa.gob.ar/tags/frutillas-frescas-y-congeladas>

- Serradilla**, M.J., Falagán, N., Bohmer, B., Terry, L.A., & Alamar, M.C. (2019). The role of ethylene and 1-MCP in early-season sweet cherry ‘Burlat’ storage life. *Scientia Horticulturae*, 258, 108787. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108787
- Severo**, J., Tiecher, A., Chaves, F.C., Silva, J.A., & Rombaldi, C.V. (2011). Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. *Food Chemistry*, 126(3), 995–1000. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.107.
- Shanmugan**, V. (2005) Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. *Microbiological Research* 160(1):83-94. doi: 10.1016/j.micres.2004.09.014.
- Sharma**, A., Sharma, H., & Upadhyay, S.K. (2020). Thaumatin-like proteins: Molecular characterization, evolutionary analysis and expression profiling in major cereal crops *Plant Science* 290, 110317. doi: 10.1101/2020.09.24.311928
- Shellie**, K.C., & Skaria, M. (1998). Reduction of Green Mold on Grapefruit after Hot Forced-Air Quarantine Treatment. *Plant disease* 82(4), 380-382. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.4.380.
- Shi**, Y., Zhang, Y., & Shih, D.S. (2006). Cloning and expression analysis of two β -1,3-glucanase genes from Strawberry. *Journal of Plant Physiology*, 163(9), 956–967. doi: 10.1016/j.jplph.2005.09.007
- Shu**, P., Min, D., Zhou, J., Ai, W., Li, J., Li, Z., Zhang, X., Shi, Z., Sun, Y., Li, F., Li, X., & Guo, Y. (2020). The Synergism of 1-Methylcyclopropene and Ethephon Preserves Quality of «Laiyang» Pears With Recovery of Aroma Formation After Long-Term Cold Storage. *Frontiers in Plant Science*, 11, 490. doi: 10.3389/fpls.2020.00490
- Shulaev**, V., Sargent, D.J., Crowhurst, R.N., Mockler, T.C., Folkerts, O., Delcher, A.L., ... Folta, K.M. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43(2), 109–116. doi: 10.1038/ng.740
- Silva**, P.A., Abreu, C.M.P. de, Queiroz, E. de R., Corrêa, A.D., & Santos, C.D. dos. (2012). Storage of strawberries (*Fragaria ananassa* L.) cv. ‘Oso Grande’, subjected to 1-MCP. *Acta Scientiarum. Technology*. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/12517>
- Singh**, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. (2010). Phenylpropanoid Metabolism in Ripening Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 398–416. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00116.x
- Solórzano**, A.C., Martín, A., Salazar, S.M., Sandoval, J.S., & Kirschbaum, D.S. (2015). Correlación entre la medida del color del fruto y la concentración de sólidos solubles totales en frutilla o fresa (*Fragaria ananassa* Duch). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 35(1), 55-60.

- Souleyre**, E.J.F., Iannetta, P.P.M., Ross, H.A., Hancock, R.D., Shepherd, L.V.T., Viola, R., Taylor, M.A. & Davies, H.V. (2004). Starch metabolism in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 369–376. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0338.x
- Symons**, G.M., Chua, Y.J., Ross, J.J., Quittenden, L.J., Davies, N.W., & Reid, J.B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4741–4750. doi: 10.1093/jxb/ers147
- Tantasawat**, P., Melkonian, J., Wolfe, D., & Steffens, J. (2004). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Science*, 167, 693–703. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.008
- Taranto**, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 377. doi: 10.3390/ijms18020377
- Tateishi**, A. (2008). β -Galactosidase and α -L-Arabinofuranosidase in Cell Wall Modification Related with Fruit Development and Softening J. Japan. Soc. Hort. Sci. 77(4): 329–340. doi: 10.2503/jjshs1.77.329
- Terry**, L., & Joyce, D.C. (2004). Influence of growing condition and associated variable efficacy of acibenzolar in suppression of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Advances in Strawberry Research*, 23, 11–19.
- Thumdee**, S., Manenoi, A., Chen, N., & Paull, R. (2010). Papaya Fruit Softening: Role of Hydrolases. *Tropical Plant Biology*, 3, 98–109. doi: 10.1007/s12042-010-9048-z
- Tian**, M.S., Prakash, S., Elgar, H.J., Young, H., Burmeister, D.M., & Ross, G. (2000). Responses of strawberry fruit to 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, 32, 83–90. doi: 10.1023/A:1006409719333
- Trainotti**, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., & Casadoro, G. (2001). Beta-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 52(361). PMID: 11479328.
- Trainotti**, L., Pavanello, A., & Casadoro, G. (2005). Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: Does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2037–2046. doi: 10.1093/jxb/eri202
- Treutter**, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. doi: 10.1055/s-2005-873009

- Van de Velde**, F., Tarola, A.M., Güemes, D., & Pirovani, M.E. (2013). Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Camarosa and Selva Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods*, 2, 120–131. doi: 10.3390/foods2020120
- Vicente**, A.R., Costa, M.L., Martínez, G.A., Chaves, A.R., & Civello, P.M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 38(3), 213-222. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.06.005
- Vicente**, A.R., Martínez, G.A., Chaves A.R., Civello, P.M. (2006). Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology* 40, 116–122. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.012
- Vicente**, A.R., Martínez, G.A., Civello, P.M., & Chaves, A.R. (2002). Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 25(1), 59-71. doi: 10.1016/S0925-5214(01)00142-9
- Vicente**, A.R., Saladié, M., Rose, J.K., & Labavitch, J.M. (2007). The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1435–1448. doi: 10.1002/jsfa.2837
- Villarreal**, N., Bustamante, C., Civello, P., & Martínez, G. (2010). Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(4), 683–689. doi: 10.1002/jsfa.3868
- Villarreal**, N., Marina, M., Nardi, C., Civello, P., & Martínez, G. (2016). Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism. *Plant Science*, 252, 1-11. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.018
- Villarreal**, N., Martínez, G., & Civello, P. (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Science*, 176(6), 749–757. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.02.019
- Villarreal**, N.M., Rosli, H.G., Martínez, G.A., & Civello, P.M. (2008). Polygalacturonase activity and expression of related genes during ripening of strawberry cultivars with contrasting fruit firmness. *Postharvest Biology and Technology*, 2(47), 141–150. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.06.011
- Vogt**, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106
- Wan** C., Kahramanoğlu İ., Chen J., Gan Z., Chen C. (2020). Effects of Hot Air Treatments on Postharvest Storage of Newhall Navel Orange. *Plants*, 9(2):170. doi: 10.3390/plants9020170
- Watkins**, C.B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, 24(4), 389-409. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.005

- Wen P.**, Chen J., Wan S., Kong W., Zhang P., Wang W., Zhan J., Pan Q., Huang W. (2007). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation* 55, 1-10. doi: 10.1007/s10725-007-9250-7
- Widiastuti**, A., Yoshino, M., Saito, H., Maejima, K., Zhou, S., Odani, H., Narisawa, K., Hasegawa, M., Nitta, Y., & Sato, T. (2013). Heat shock-induced resistance in strawberry against crown rot fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and molecular plant pathology* 84, 86-91. doi: 10.1016/j.pmpp.2013.08.003
- Willats**, W.G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J.P. (2001). Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1–2), 9–27. doi: 10.1023/A:1010662911148
- Winkel-Shirley**, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218–223. doi: 10.1016/s1369-5266(02)00256-x
- Wu**, H.C., Bulgakov, V.P., & Jinn, T.L. (2018). Pectin Methylsterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1612. doi: 10.3389/fpls.2018.01612
- Xu**, J., Belanger, F., & Huang, B. (2008). Differential gene expression in shoots and roots under heat stress for a geothermal and non-thermal *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.11.011
- Yang**, K., Lim, C., Hong, J., Park, C.Y., Cheong, Y.H., Chung, W., Lee, K., Lee, S.Y., & Cho, M. (2006). Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Science* 171, 175-182. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.03.013
- Yeh**, S.Y., Huang, F.C., Hoffmann, T., Mayershofer, M., & Schwab, W. (2014). FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in Plant Science*, 5, 518. doi: 10.3389/fpls.2014.00518
- Yoshikawa** F., Mitchell F., Mayer G. (1992). To control postharvest decay and insects, moist heat treatments of strawberries are studied. *California Agriculture* 46(2), 26-28.
- Youryon**, P., & Wongs-Aree, C. (2015). Postharvest application of calcium chloride affects internal browning reduction during low temperature storage of «Sawi» pineapple. *Acta Horticulturae*, 1088, 197-200. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1088.29
- Zeng**, L., Shi, L., Lin, H., Lin, Y., Lin, Y., & Wang, H. (2021). Paper-containing 1-methylcyclopropene treatment suppresses fruit decay of fresh Anxi persimmons by enhancing disease resistance. *Food Quality and Safety*, 5, doi: 10.1093/fqsafe/fyab007

- Zhang, H.,** Chen, L., Sun, Y., Zhao, L., Zheng, X., Yang, Q., & Zhang, X. (2017). Investigating Proteome and Transcriptome Defense Response of Apples Induced by *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(4), 301–311. doi: 10.1094/MPMI-09-16-0189-R
- Zhang, L.,** Zhao, S., Lai, S., Chen, F., & Yang, H. (2018). Combined effects of ultrasound and calcium on the chelate-soluble pectin and quality of strawberries during storage. *Carbohydrate Polymers*, 200, 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.013>
- Zhang, Z.,** Tian, S., Zhu, Z., Xu, Y., & Qin, G. (2012). Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and resistance of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) fruit against postharvest disease. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 13-19. doi: 10.1016/j.lwt.2011.07.030
- Zhou, H.,** Li, G., & Zhao, X. (2016). Comparative analysis of pectate lyase in relation to softening in strawberry fruits. *Canadian Journal of Plant Science* 96(4): 604-612. doi: 10.1139/cjps-2015-0323

El presente manuscrito corresponde a la versión final de la Tesis de doctorado de Silvia E. Langer. La misma incluye las sugerencias de los/las evaluadores/as del trabajo: Dra. Claudia A. Bustamante (CEFOBI, UNR); Dr. Gustavo A. Polenta (INTA) y Dra. Karina E.J. Tripodi (CEFOBI, UNR).



Silvia E. Langer

(Tesisista)



Natalia M. Villarreal

(Directora)



Pedro M. Civello

(Codirector)