



# Revisión bibliográfica MEJORA GENÉTICA DE LA FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.), A TRAVÉS DE MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

## Review

### Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) breeding through biotechnology methods

Argelys Kessel Domini<sup>✉</sup>

**ABSTRACT.** Strawberry is one of the fruits of greater worldwide acceptance and is also one that has more uses, which include export and import as a fresh product in the food industry as flavoring (in the preparation or pastry shop) among others. However, after extensive studies in the crop, it was discovered that this fruit is not only interesting for its quality as a dessert, but also a very healthy food that brings a wealth of beneficial substances for the body. Although it might seem impossible strawberry production in Cuba, due to the characteristics of climate, and the introduction of this fruit began many years ago with the purpose of marketing to the tourist resorts as fresh fruit or raw material, but in the recent decades, productions have been very limited because the crop is affected by biotic and abiotic yet been observed that cultivars with those present have very poor quality fruit. And it would be meaningful to assess the possibility of undertaking programs to expand the number of strawberry production while Cuban varieties adapted to weather conditions while responding in favor of alternatives undertaken in the country to reduce imports. Hence in this paper aims to review the different methods used for biotechnological genetic improvement of strawberry such as: the application of different techniques of tissue culture, the characterization of strains by biochemical and molecular markers and the identification of genes associated with fruit ripening.

**RESUMEN.** La fresa es una de las frutas de mayor aceptación mundial y es también una de las que tiene mayores usos, entre los que se encuentran su exportación e importación como producto fresco, en la industria alimenticia, como saborizante (en la elaboración o repostería), entre otros. No obstante, y tras amplios estudios en el cultivo, se ha descubierto que este fruto no solo es interesante por su calidad como postre, sino además es un alimento muy sano, que aporta gran cantidad de sustancias beneficiosas para el organismo. Aunque pudiera parecer imposible la producción de fresas en Cuba, debido a las características del clima, la introducción de esta fruta comenzó hace muchos años con el propósito de la comercialización a los polos turísticos en calidad de fruta fresca o materia prima, pero en las últimas décadas sus producciones se han visto muy limitadas debido a que este cultivo es muy afectado por factores bióticos y abióticos tales como: las plagas y enfermedades, las altas temperaturas y a la vez se ha observado que los cultivares con los que contamos presentan muy mala calidad de fruto. Por lo que resultaría significativo valorar la posibilidad de emprender programas con el fin de ampliar el número de producciones de fresa y a la vez variedades cubanas más resistentes y, al mismo tiempo, responder a favor de las alternativas asumidas en el país para reducir las importaciones. De ahí que en este trabajo se pretende hacer una revisión sobre los diferentes métodos biotecnológicos empleados para la mejora genética de la fresa como son: la aplicación de diferentes técnicas del cultivo de tejidos, la caracterización de variedades mediante marcadores bioquímicos y moleculares, así como la identificación de genes asociados a la maduración de frutos.

*Key words:* strawberry, cultivate, breeding

*Palabras clave:* fresa, cultivar, mejora genética

Argelys Kessel Domini, Aspirante a Investigador del departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700.

✉ argelys@inca.edu.cu

## INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) es una planta perteneciente a la familia Rosácea, considerada fruta de placer por excelencia (1). Se destaca por su contenido de vitamina

C, taninos, flavonoides, antocianinas, catequina, quercetina, kaempferol y ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico) (2). Estudios preliminares con animales indican que las dietas ricas en fresas también pueden tener el potencial para proporcionar

salicílico y eláxico y minerales (K, P, Ca, Na y Fe) además de pigmentos y aceite esencial (3, 4). Estos compuestos presentes en la fresa tienen un potente poder antioxidante y ayudan a disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares, mejoran la función endotelial vascular y disminuyen la trombosis (5). Por otra parte, se ha demostrado en varios sistemas experimentales la actividad anticancerígena de extractos de fresas, así como su bloqueo de iniciación de la carcinogénesis y los beneficios para el envejecimiento cerebral (2, 6, 7).

La fresa es una de las frutas de mayor aceptación mundial y es también una de las que tiene mayores usos, entre los que se encuentran su exportación e importación como producto fresco, en la industria alimenticia, como saborizante (en la elaboración o repostería), entre otros. Se dice que la composición química y los atributos de calidad de la fresa son altamente influenciados por la combinación de varios factores, entre los que se encuentran los genéticos (variedad) y geográficos (clima y suelo) entre otros (8).

La producción de fresas en Cuba se inició hace unos años en el interior del país con el propósito de la comercialización a los polos turísticos en calidad de fruta fresca o materia prima (9). Sin embargo, debido a las características del propio clima, la propagación de la fruta se ha visto muy limitada por la incidencia de factores bióticos y abióticos, tales como: el ataque de plagas y enfermedades, las altas temperaturas que azotan al país durante los meses de julio y agosto y a la vez se ha observado que los cultivares con los que se cuentan presentan muy mala calidad de fruto. Por lo que resultaría valioso emprender programas de mejora genética con el fin de ampliar el número de producciones y a la vez variedades cubanas adaptadas a las condiciones climáticas. Además de responder a favor de las alternativas asumidas en el país para reducir el número de importaciones.

Los programas de mejoramiento para el cultivo han estado encaminados

a obtener variedades de días cortos de porte intermedio y elevada productividad, resistentes a enfermedades de mayor incidencia, con frutos de buen sabor y aroma y de color rojo brillante (10), a la vez se han aplicado diversas técnicas *in vitro* como la embriogénesis somática, el cultivo de meristemos y la variación somaclonal que han apoyado a la obtención de plantas de mayor vigor y número de estolones. Además con los avances en la biología molecular se han implementado una serie de herramientas que han permitido de forma rápida y eficiente analizar la diversidad genética existente entre los cultivares de fresa y la caracterización de genes.

De ahí que en este trabajo se pretende hacer una revisión sobre los diferentes métodos biotecnológicos empleados para la mejora genética de la fresa como son: la aplicación de diferentes técnicas del cultivo de tejidos, la caracterización de variedades mediante marcadores bioquímicos y moleculares, así como la identificación de genes asociados a la maduración de frutos.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PLANTA DE FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.)

La fresa es una planta de la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoidea, tribu Potentilla y género *Fragaria*. Los cultivares más utilizados en la actualidad son cruzamientos de las especies: *Fragaria vesca*, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria virginiana* y la *Fragaria grandiflora* (9).

Por las características de su fruto es llamado fruto del placer por excelencia, sinónimo de primavera, aunque en la actualidad, gracias a las tecnologías de post-recolección y envasado puede ser consumida prácticamente durante todo el año. En el mercado de las frutas, la fresa ocupa un lugar importante ya que como fruta es cómoda de comer y apetecible (11).

Es una planta herbácea, perenne y posee un rizoma cilíndrico de tallos rastreros que al cabo de cierto estado de desarrollo emite ramificaciones de gran longitud llamadas estolones. Estos están constituidos normalmente por dos entrenudos de 10 a 20 cm de longitud y una yema terminal que forma una nueva planta al desarrollarse. El follaje normal de la planta se conforma por hojas compuestas trifoliadas. La flor está dispuesta en corimbo, una inflorescencia en la que los pedúnculos florales nacen en distintos puntos del eje y terminan aproximadamente a la misma altura. Los pedúnculos son pilosos y constan de un cáliz de cinco sépalos, de una corola de cinco pétalos blancos y numerosos estambres amarillos insertados en los contornos de un receptáculo converso (9).

Es importante destacar que lo que se conoce como fruta de la fresa es en realidad un falso fruto producto del engrosamiento del receptáculo floral. Sobre este falso fruto se encuentran gran cantidad de semillas, que son los verdaderos frutos y se denominan aquenios. Las raíces son fibrosas y poco profundas. La planta de fresa es perenne, debido a que por su sistema de crecimiento, constantemente está formando nuevos tallos, lo que permite que permanezca viva por tiempo indefinido (11).

Se dice que aunque este cultivo por su origen prefiere los climas fríos, también puede cultivarse en climas medios. La fresa se desarrolla en climas entre 10 y 25°C, siendo el óptimo entre 12 y 18°C. Los factores climáticos para el cultivo a considerar como perjudiciales, son las heladas y los vientos fríos y los propicios para un buen desarrollo de la fresa son los días soleados con fotoperíodo de ocho horas y una temperatura media de 15°C y noches frescas (9).

La fresa se introdujo en Cuba por primera vez a mediados de los años 60 por la zona de Banao, provincia Sancti Spíritus, cuando especialistas cubanos intentaron aclimatar este cultivo a las condiciones de nuestro país (12) y posteriormente se extendió a áreas habaneras cuyas producciones

eran para la industria láctea fundamentalmente (11).

Los principales cultivares adaptables al clima cubano son: Misionaria o fresa criolla, Chandler, Oso Grande, Parker, Rabunda, Tiago, Solana, Aiko y Fresno (11, 12) que requieren temperaturas medias de 20 a 25°C.

## MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE LA FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.)

La fresa es un vegetal que puede vivir por mucho tiempo; sin embargo, se mantiene en producción económicamente rentable, durante los primeros dos años. En plantaciones de mayor edad, las plantas se muestran débiles, con bajo rendimiento y frutos de menor calidad, debido a una mayor incidencia de plagas y enfermedades (13).

Por ser una planta híbrida, no se utilizan sus semillas para propagarla. Su sistema de crecimiento y formación de nuevas coronas y estolones permite una propagación vegetativa rápida y segura.

Esta planta normalmente se propaga por estolones, obtenidos de plantas madres que han estado sometidas a largos períodos de frigoconservación, característica que estimula un gran crecimiento vegetativo cuando son llevadas al campo (13).

Se dice que la adecuación de nuevas tecnologías para el cultivo de la fresa, presenta inconvenientes por su falta de difusión y uso. La dificultad que afrontan los trabajos de mejoramiento convencional en esta especie, son básicamente la lentitud y los altos costos, ya que se requieren entre 10 a 15 años para la creación de una nueva variedad. Una alternativa de solución a estas limitaciones, son las técnicas de cultivo *in vitro* (14), que permiten la propagación clonal rápida de un gran número de plantas. De aquí que muchos investigadores se han dedicado a la implementación de las mismas, en vistas a mejorar el cultivo de la fresa.

## EMPLEO DE TÉCNICAS DE CULTIVO *In Vitro* EN FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.)

Muchas experiencias señalan que las plantas de fresa procedentes del cultivo de tejidos producen mayor número de estolones que las plantas propagadas por métodos tradicionales, conjuntamente son más uniformes y sobreviven más en el campo, debido a que poseen un excelente vigor y una óptima producción de frutos (15).

A pesar de las bondades que le brinda la propagación *in vitro* al cultivo, para su empleo se debe tener en cuenta dos factores muy importantes; la alta pubescencia de los tejidos y el contacto directo con el suelo, que inducen una gran contaminación de los explantes, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes del campo (16). Estos contaminantes pueden ocasionar la muerte de los tejidos, competir con ellos o modificar el medio de cultivo (17).

Además, frecuentemente ocurre el ennegrecimiento del tejido, con posterior necrosis del explante. Para evitarlo se sugiere disminuir la intensidad de la luz, agregar antioxidantes en el medio y subcultivar con frecuencia, incrementar las sales de calcio, reducir el nivel de nitrato en el medio y sumergir el material que se va a micropropagar en medio líquido por un día (15).

Teniendo en cuenta estas limitaciones para el establecimiento *in vitro* de explantes de fresa varios investigadores evaluaron diferentes procedimientos de desinfección superficial, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (10, 20 y 30 %) en diferentes tiempos de exposición (10, 20 y 30 minutos) y tres tipos de antioxidantes (cisteína 4 g.L<sup>-1</sup>; ácido ascórbico 150 mg.L<sup>-1</sup>; ácido cítrico 150 mg.L<sup>-1</sup>) para controlar la contaminación y la oxidación fenólica (18). Estos autores apreciaron que con la inmersión de los explantes en la solución de cloro al 20 % durante 20 minutos se controló la contaminación por hongos y bacterias

y, a la vez, los explantes sometidos a este tratamiento, indujeron la mayor formación de brotes y con la adición de 4 g.L<sup>-1</sup> de cisteína en presencia de luz, lograron reducir la oxidación de los tejidos.

A la vez se han reportado experiencias de la aplicación de varias técnicas de cultivo de tejido en fresa, una de ellas es la embriogénesis somática alternativa que se ha convertido en un prerrequisito indispensable de la biotecnología en la mejora genética de las plantas, debido a que facilita la propagación clonal a gran escala y el empleo de la semilla artificial<sup>1</sup>.

En este estudio el material de partida fueron explantes foliares donde emplearon el Tydiazurón (TDZ) (4 mg.L<sup>-1</sup>) y obtuvieron 31 embriones somáticos por explante y el mayor porcentaje de germinación (48 %), se obtuvo en el medio con Kinetina 1.0 mg.L<sup>-1</sup> (21). Igualmente, en otra experiencia realizada en el cultivo, combinaron el regulador del crecimiento 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4D) 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, con Bencilaminopurina (BAP) 0.5 mg.L<sup>-1</sup> y prolina 50 % y se adquirieron altos porcentajes de cultivos con embriones somáticos (19).

Considerando estas metodologías, se realizaron un estudio con el objetivo de regenerar plántulas de fresa procedentes de explantes de hoja, utilizando como sustancias inductoras el Ácido Naftalenacético (ANA) y el (BAP). Para ello se empleó el 2,4 D para inducir la formación de callos, el ANA para el crecimiento de los embriones y el BAP para la germinación de los mismos (14). Estos autores alcanzaron porcentajes muy altos de callos embriogénicos 73.34 % y consideraron que la combinación de ANA (0,54 µM) y BAP (0,44 µM) fue la más apropiada para producir el mayor número de embriones. Con la concentración de BAP (4,44 µM) germinaron favorablemente los embriones somáticos.

<sup>1</sup>González, O. S. Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomoea batata* L. Lam). [Tesis de doctorado]; INCA, 2006, 120 p.

Otra de las técnicas empleadas que ha permitido la producción de estolones de alta calidad fitosanitaria, ha sido mediante el cultivo de meristemos.

En el siguiente estudio emplearon meristemos de estolones provenientes del campo, de la especie (*Fragaria chiloensis* D.) para la producción de plántulas *in vitro* libre de patógenos (20). Los estolones fueron sometidos a un proceso de desinfección con Hipoclorito de sodio al 2.5 % durante varios tiempos de exposición 5 y 10 min., se le aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a realizar el corte de los meristemos y se sembraron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) complementado con 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), después de desarrollados los meristemos se multiplicaron en un medio complementado con 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP que induce la formación de yemas axilares a partir de las cuales se obtuvieron nuevas plántulas, que pasaron a la fase de enraizamiento hasta que lograran desarrollar un sistema radicular bien conformado.

Durante muchos años la variación somaclonal ha sido una de las técnicas biotecnológicas que se ha empleado para el mejoramiento genético de variedades en diversos cultivos (21), debido a que constituye una forma rápida de generar variabilidad genética, particularmente para cultivos con base genética estrecha y que son difíciles de mejorar a través de técnicas tradicionales. Igualmente es exitosa para eliminar uno o pocos defectos en cultivares bien adaptados y puede utilizarse para mejorar especies de propagación sexual y vegetativa.

Sobre la fresa se han reportado diferentes estudios donde a partir de la inducción de callos y la regeneración se han obtenido variantes somaclonales. En la presente investigación valoraron el efecto de varios reguladores del crecimiento vegetal en la respuesta *in vitro* de explantes de fresa. El medio MS suplementado con 2,4 D (3 mg.L<sup>-1</sup>) y BAP (0.5 mg.L<sup>-1</sup>) fue el método más

eficiente en la formación y el desarrollo de callos y con las combinaciones de ANA (0.75 mg.L<sup>-1</sup>) y BAP (1.5 mg.L<sup>-1</sup>), se obtuvieron altos porcentajes de inducción y regeneración de múltiples brotes (22).

### **ESTUDIOS SOBRE CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.)**

La caracterización bioquímica y molecular ofrece una serie de oportunidades, entre ellas, la de ser una alternativa para estimar la diversidad genética de las colecciones (23) y, por tanto, ayudar a establecer criterios para mejorar la representatividad de las mismas. Sin embargo, esta caracterización no necesariamente sustituye la realizada para características morfológicas y agronómicas, ya que los dos tipos de información muestran facetas diferentes de la diversidad.

En la caracterización morfológica es frecuente realizar complejas mediciones durante varios años para asegurar la fiabilidad de los resultados. Debido al gran número de caracteres a analizar, a veces puede ser de difícil ejecución e incluso puede resultar inoperante cuando se quieren obtener resultados a corto plazo (24).

Las isoenzimas, o formas moleculares múltiples, que caracterizan una misma reacción, han sido ampliamente utilizadas en las investigaciones biológicas, producto de las ventajas que las mismas ofrecen sobre muchos marcadores morfológicos, debido, fundamentalmente, a que estas rara vez producen efectos deletéreos obvios en el fenotipo por recesividad y pleiotropía (25). Las enzimas llevan a cabo la misma función, pero tiene una diferente composición de aminoácidos y pueden diferir en sus propiedades cinéticas. Sometidas a electroforesis y visualizadas mediante diferentes métodos de tinción, estas bandas brindan información como marcadores

codominantes (26). Sin embargo, las desventajas que presentan estos marcadores son las modificaciones que sufren en los procesos postranscripcionales, el escaso número de enzimas visualizadas en un organismo, la necesidad de tener un tejido fresco o debidamente conservado para obtener actividad enzimática y la poca resolución que se obtiene, entre otras<sup>2</sup>.

En este sentido, se debe señalar que las técnicas electroforéticas posibilitan el estudio de la variación genética y las similitudes y diferencias entre organismos al nivel de su composición isoenzimática o proteica, independientemente del efecto que puede ejercer el medio ambiente (27). Esto permite realizar una caracterización a nivel molecular de la cantidad y tipo de variabilidad genética existente entre especies estrechamente relacionadas, dado que en este caso la variación de los patrones de bandas, en general, pueden ser directamente igualados a la variación en el código genético (28).

El estudio de la variabilidad genética existente en las poblaciones resulta de gran importancia desde el punto de vista evolutivo, del mejoramiento genético en plantas y el manejo racional del material (29). La medida más directa de dicha variabilidad reside en el análisis del ADN en cada individuo de la población o de una muestra de ella, pero algunas técnicas de marcadores de ADN por su complejidad encarecen el proceso y ante estas circunstancias el estudio de las moléculas bioquímicas codificadas por los genes, resulta la información más cercana al ADN (30).

En los últimos años se han realizado investigaciones, combinando los estudios electroforéticos de isoenzimas con las técnicas moleculares de ADN, empleando las técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*), AFLP (*Amplified Fragment*

<sup>2</sup>Trujillo, G. Desarrollo de marcadores SCAR y CAPS en un QTL con efecto importante sobre la resistencia al tizón tardío de la papa. [Tesis de doctorado]. UNMSN, Lima, Perú. 2005, 120 p.

*Length Polymorphism*) y SSR (*Simple Sequence Repeats*). Sus aplicaciones han sido principalmente para la construcción de mapas de ligamiento, detección de la variación somaclonal, la caracterización de los bancos de germoplasma y el establecimiento de relaciones filogenéticas (31).

Tal es así, que en este estudio con la aplicación de la técnica de AFLP en (*Fragaria x ananassa*) permitió la identificación de variedades en la especie, no identificables previamente usando la técnica de isoenzimas o RAPDs. Como resultado del análisis, los autores de dicha investigación, obtuvieron un bajo nivel de polimorfismo entre todos los cultivares comerciales analizados y entre estas y el cultivar silvestre (*Fragaria chiloensis*). Además, se observó que el polimorfismo fue mayor cuando se comparó el cultivar silvestre diploide (*Fragaria vesca*)<sup>3</sup>. Adicionalmente se caracterizó el gen de fresa (FaMIP21) inducible durante el proceso de maduración del fruto y se determinó que se expresa en todos los tejidos analizados aumentando su expresión en frutos durante la maduración y que además su expresión está regulada en las hojas.

Años más tardes, otros investigadores con el objetivo de disponer de un método rápido y eficiente para la identificación de cultivares de fresa, caracterizaron mediante el marcador RAPD una colección de germoplasma silvestre, con el objetivo de analizar la diversidad genética presente en poblaciones de *Fragaria chiloensis*. Además identificaron un gen específico que codifica una cistatina, proteína inhibidora de cistein proteasas, la cual puede ser usada como fuente de resistencia contra plagas y enfermedades. Se identificaron 39 variedades comerciales y en el caso de los 102 genotipos silvestres analizados, se amplificaron 119 bandas RAPD, de las cuales 102 (85.7 %) presentaron polimorfismo,

confirmándose su elevado grado de diversidad genética, igualmente se comprobó que existe correlación entre las distancias genéticas y sus características morfológicas, así como las áreas de distribución geográfica. La caracterización del gen (Cif-1) que codifica una cistatina denominada Fa-CPI-1 se realizó a partir de un fragmento de secuencia expresado (EST) obtenido del fruto de fresa y se comprobó que este gen se expresa fuertemente en hojas y aquenios, y presenta un nivel de expresión más débil en raíces. Con los resultados de esta investigación demostraron las propiedades inhibitorias de esta molécula (Fa-CPI-1 proteína recombinante que inhibe el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*), que son unas de las principales enfermedades en este cultivo<sup>4</sup>.

Otras de las investigaciones realizadas determinaron la diversidad genética de una muestra representativa de fresas chilenas usando marcadores bioquímicos y moleculares; conjuntamente se comparó la información previamente generada por la amplificación del ADN del polimorfismo amplificado al azar (RAPD) en las mismas accesiones; y se empleó esta información en un programa de mejoramiento para la especie. También se analizaron 83 accesiones silvestres con los sistemas enzimáticos fosfogluco isomerasa (GPI), leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfoglucomutasa (PGM) y 61 accesiones mediante la amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP). Los niveles de diversidad genética detectados en las accesiones analizadas en este estudio, mediante isoenzimas y AFLP, fueron bajos, considerando que estos genotipos se seleccionaron teniendo en cuenta diferentes características morfo-agronómicas, y además provienen de diferentes hábitats y regiones geográficas. El uso de diferentes

sistemas enzimáticos en fresa indicó que solo tres sistemas funcionaron adecuadamente. Estos sistemas proporcionaron resultados claros y consistentes a través de todo el estudio (32).

Otra de las líneas de investigación con fines de mejoramiento genético a través de técnicas moleculares, que se han llevado a cabo en el cultivo de la fresa, fueron la identificación de huellas dactilares en seis cultivares de la especie, mediante el marcador ISSR. Se amplificaron un total de 102 fragmentos, de los cuales 86 (84.3 %) fueron polimórficos. El análisis demostró que las seis variedades se agruparon en dos grupos, el primero mostró un índice de similitud de 83 %, mientras que el segundo un 45 % (33). Estos autores afirmaron que la técnica empleada ISSR constituye una herramienta, para la identificación de variedades de fresa, porque es simple, rápida y rentable, altamente discriminante y fiable.

De manera general, podemos afirmar que la importancia del análisis molecular, consiste en que proporciona un estimado de la variabilidad genética, basándose en la presencia de genes comunes (34), además de ofrecer nuevas posibilidades para el manejo de una colección (35).

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DIRIGIDA A ESTUDIOS DE CALIDAD DE FRUTO DE FRESA (*Fragaria ananassa* Duch.)

Los avances en biología molecular de los últimos 15 años han posibilitado el conocimiento del control molecular del desarrollo y maduración del fruto. La mayor parte de estos estudios se han desarrollado en tomate (36, 37) donde se ha identificado la gran complejidad del control de caracteres individuales como el tamaño, la forma, la firmeza o el contenido en azúcares y ácidos orgánicos (38). El fruto de fresa difiere significativamente del tomate, ya que este deriva del tejido ovárico, mientras que el fruto de fresa deriva del receptáculo. Además, la fresa es un

<sup>3</sup> Sánchez, J. F. Estudios moleculares de la variabilidad genética y del proceso de maduración de la fresa (*Fragaria sp.*). [Tesis de doctorado]; Facultad de Ciencias, Málaga, España. 1999, 99 p.

<sup>4</sup> Gambardella, M. Diversidad genética en germoplasma de fresa y caracterización de un gen de cistatina. [Tesis de doctorado]; Escuela Politécnica de Ingenieros Agrónomos, Madrid, España. 2003, 100 p.

fruto no climatérico, por lo que se dice que es un sistema modelo atractivo para el estudio del desarrollo y maduración en frutos no climatéricos.

Potencialmente, se ha demostrado que la vida útil postcosecha de la fresa destinada al consumo directo es muy breve, debido principalmente al proceso de ablandamiento que sufre su maduración. Esto limita su comercialización tanto por el deterioro en sí del fruto como por la mayor susceptibilidad al ataque de patógenos provocada por el ablandamiento. Por lo tanto, es de fundamental importancia profundizar en el conocimiento de los factores involucrados en este proceso, a fin de encontrar tecnologías postcosecha adecuadas para prolongar la vida útil del fruto.

Relacionados con este proceso, en los últimos años, varios grupos de investigación han encaminado sus estudios de la maduración de la fresa a nivel de la genética molecular, lo que ha permitido aislar y clonar un gran número de genes. Estos estudios se realizaron no solo por el interés comercial que reviste el fruto, sino también porque la fresa es considerada un sistema modelo para el estudio del desarrollo y maduración de los frutos no climatéricos (39).

En uno de los primeros trabajos orientados a identificar genes asociados a la maduración de los frutos de fresa, se aislaron 66 clones pertenecientes a 26 familias de genes no redundantes. Estos genes codificaban para proteínas involucradas en los procesos metabólicos claves, incluyendo: la síntesis de antocianinas, la degradación de la pared celular y proteínas, el metabolismo de lípidos, sacarosa y la respiración (40).

Unos años después, la tecnología de microarreglos (microarrays) se convirtió en un medio poderoso para estudiar el perfil de expresión de múltiples genes de fresa (41). En este trabajo se construyó un microarray usando 1701 ADN complementarios (ADNc), que comprendían 1100 fragmentos de secuencia expresado (ESTs) y 601 ADNc sin secuenciar provenientes de frutos maduros,

incluyendo aquenios. Estos microarrays han sido utilizados para monitorear la expresión genética en fresa sometida a distintas condiciones: comparación de distintos estadios de desarrollo; tejido de receptáculo versus tejido de aquenio (42) y cultivares de diferente firmeza (43).

Como bien mencionábamos anteriormente, uno de los principales factores que determinan el deterioro postcosecha de los frutos es el excesivo ablandamiento (44), con el fin de conocer los distintos fenómenos que contribuyen al proceso, se estudió la participación de las expansinas (proteínas que participan en el desensamblaje de la pared celular) en el ablandamiento de los frutos.

Teniendo en cuenta que en el cultivo de la fresa se conocen siete genes que codifican para esta proteína, los autores de esta investigación decidieron trabajar con tres cultivares de fresa (Camarosa, Selva y Toyonaka) que presentan firmeza contrastante durante el proceso de maduración y se analizó la expresión de los genes FaEXP2 y FaEXP5 que se expresan específicamente durante la maduración y los genes FaEXP1, FaEXP4 y FaEXP6 cuya expresión no solo se encuentra en el fruto sino en otros tejidos de la planta, a fines de dilucidar si existía una correlación entre la expresión de los genes de expansina y la firmeza de las variedades<sup>5</sup>. Ellos lograron establecer dicha correlación entre la expresión de los genes FaEXP1, FaEXP2 y FaEXP5 en los estadios iniciales de la maduración y a la vez comprobaron que la acumulación de proteínas expansinas es mayor al inicio de la maduración en Toyonaka que en Camarosa.

Igualmente, la compleja regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa es poco conocida, si bien estudios recientes ponen de manifiesto la intervención de 27 genes relacionados

<sup>5</sup>Dotto, M. Participación de expansinas en el ablandamiento de frutilla: regulación hormonal, expresión en distintas variedades y efecto de la aplicación de tratamientos físicos. [Tesis de doctorado]; Universidad Nacional de General San Martín. 2008, 174 p.

con la síntesis de hormonas<sup>6</sup>; 14 de ellos están relacionados con la síntesis de auxinas; tres están implicados en la síntesis de brasinoesteroides; dos intervienen en la síntesis de citoquinas; dos están relacionados con la síntesis de giberelinas; uno es responsable de la síntesis de ácido abscísico y cinco están implicados en la síntesis de etileno.

Muchos de los caracteres más interesantes de cara a la mejora genética de la fresa están involucrados en el desarrollo y maduración del fruto (textura, síntesis y acumulación de azúcares y ácidos orgánicos, polifenoles y vitaminas, entre otros) y su control genético escapa aun a nuestro conocimiento. Entre las variedades comerciales de fresa podemos encontrar frutos de formas y tamaños muy variados, diferentes texturas y colores, distinto contenido en sólidos solubles, polifenoles y capacidad antioxidante (45). En otras especies de la familia *Rosaceae* se han identificado QTLs con importantes efectos sobre la calidad del fruto que están siendo incorporados en diferentes programas de mejora genética de variedades comerciales, como es el caso de los géneros *Prunus* (46) y *Malus* (47, 48). El control sobre estos caracteres permitiría incrementar la calidad nutricional del fruto de fresa o reducir los daños producidos durante el transporte de la fruta, así como generar nuevas variedades que pudieran satisfacer las necesidades cambiantes del mercado.

## CONCLUSIONES

- ❖ Las técnicas *in vitro* constituyen una alternativa eficiente para la adecuación de nuevas tecnologías para el cultivo de la fresa, teniendo en cuenta también que, la formación de nuevas coronas y estolones, permiten una propagación vegetativa rápida y segura.

<sup>6</sup>Bombarely, A. Estudio mediante el uso de herramientas genómicas y bioinformáticas del desarrollo y maduración del fruto de fresa. [Tesis de doctorado]; Universidad de Málaga. 2007, 250 p.

- ❖ Los estudios de variabilidad genética, mediante marcadores moleculares como AFLP, RAPD e ISSR y marcadores bioquímicos como fosfogluco isomerasa (GPI), leucina aminopeptidasa (LAP), y fosfoglucomutasa (PGM); empleados para la caracterización e identificación de variedades de fresa resultaron una herramienta valiosa para la estimación de la variabilidad existente en la especie y además ofrece nuevas posibilidades para el manejo de una colección.
- ❖ La caracterización del gen de fresa (FaMIP21) inducible durante el proceso de maduración del fruto, a través del marcador AFLP, determinó que este gen se expresa en todos los tejidos analizados aumentando su expresión en frutos durante la maduración y que además su expresión está regulada en las hojas.
- ❖ La aplicación del marcador RAPD, como un método rápido y eficiente para la identificación de variedades de fresa, comprobó que existe correlación entre las distancias genéticas y sus características morfológicas, así como las áreas de distribución geográfica de los cultivares evaluados.
- ❖ La aplicación del marcador ISSR constituyó una herramienta valiosa, para la identificación de variedades de fresa, porque se considera: simple, rápida y rentable, altamente discriminante y fiable.
- ❖ La genética molecular dirigida a estudios de maduración de las frutas de fresa apoya a profundizar en el conocimiento de los factores involucrados en este proceso, así como encontrar tecnologías postcosecha adecuadas para prolongar la vida útil del fruto.

## REFERENCIAS

1. Bello, J. L. y Santos, A. Imagen del fresón en el consumidor. *Especial Huelva*, 1990, p. 27-29.
2. Hannum, S. M. Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, vol. 44, p. 1-17.
3. Pinto, M.; Lajolo, M. y Genovese, M. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 2008, vol. 107, p. 1629-1635.
4. Ozcan, M. y Haciseferogullar, H. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, 2007, vol. 78, p. 1022-1028.
5. Beattie, J.; Crozier, A. y Duthie, G. Potential health benefits of berries. *Current Nutrition and Food Science*, 2005, vol. 1, p. 71-86.
6. Olsson, M. E.; Gustavsson, K. E.; Andersson, S.; Nilsson, A. y Duan, R. D. Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, p. 7264-7271.
7. Meyers, K. J.; Watkins, C. B.; Pritts, M. P. y Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, p. 6887-6892.
8. Quero, E.; López, M. y Macías, L. Caracterización de tres cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) por espectroscopia de infrarrojo medio y quimioterapia. *Agrociencia*, Texcoco, México. Septiembre/octubre, 2004, vol. 38, no. 005, p. 487-495.
9. Feriol, X. Propiedades nutritivas y otras curiosidades de la fresa. *Citrifruit*, julio-diciembre, 2010, vol. 27, no. 1, 72-74.
10. Bartual, R.; Marsal, J. I. y López-Aranda, J. M. Andana y Carisma dos nuevas variedades de fresa que ofrecen una gran capacidad productiva. *Vida Rural*, 2000, no. 105, 54-57.
11. Clavejo, R.; Beltrán, A. y LLauger, R. E. Apuntes sobre el cultivo de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). *Citrifruit*, julio-diciembre, 2010, vol. 27, no. 1, p. 67-70.
12. Boletín de noticias. Cuba se inicia en el cultivo de fresas. Actualidad cubana. Guía de Cuba, 2010. Disponible en: <<http://www.guiacuba.info/noticias-de-cuba/cuba-se-inicia-cultivo-fresas>>.
13. Agrocadena de fresa. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección Regional Central Occidental. Alajuela, Grecia, 2007, p. 7-8.
14. Valderrama, S.; Chico, J.; Tejada, J. y Vega, A. Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa (*Fragaria virginiana*), utilizando ANA y BAP. *REDBIOL*, julio-diciembre, 2008, vol. 28, no. 2.
15. Swartz, H. J. y Lindstrom, J. T. Small fruit and grape tissue culture from 1980 to 1985: Commercialization of the technique. En: R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag and R. H. Lawson (EDS). Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. *Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht* (Netherlands), 1986, p. 201-220.
16. Villalobos, V. M. y Pérez, M. G. Alta producción de plantas de fresa libres de virus a partir del cultivo de meristemos. *Proc. Tropical Región. ASHS*, 1979, vol. 23, p. 70-72.
17. Mroginski, L. A. y Roca, W. M. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca, W. M. Mroginski, L. A. (EDS). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT: Colombia, 1991, p. 19-40.
18. Sánchez, M. C. y Salaverría, J. L. Control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa. *UDO Agrícola*, 2004, vol. 4, no. 1, p. 21-26.
19. Amjad, M.; Aquill, H. S.; Bhat, B.; Qadri, T.; Kamaluddin, L.; Abdin, A. M. A high efficiency direct somatic embryogenesis system for Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Cultivar Chandler. *J. Crop Sci Biotech*, 2008, vol. 11, no. 2, p. 100-107.
20. Manosh, K. B.; Islam, R. y Hossain, M. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus cultura. *Plant Cell Tissue Orlan Cult.*, 2007, vol. 90, p. 49-54.
21. Saavedra, A. Producción de plántulas *in vitro* de frutilla (*Fragaria chiloensis* D.) libre de patógenos. *Andenes*, 2005, vol. 3, no. 5, p. 16-17.
22. Sakila, S.; Ahmed, M. B.; Roy, U. K.; Biswas, M. K.; Karim, R.; Razvy, M. A.; Hossain, M.; Islam, R. y Hoque, A. Micropropagation of Strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.). A Newly Introduced Crop in Bangladesh, *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2007, vol. 2, no. 2, p. 151-154.

23. Rezaul, M.; Abdul, M.; Krisna, U.; Aminul, M. y Monzur, M. *In vitro* response of strawberry (*Fragaria x ananassa Dutch.*) for callus induction and shoot regeneration. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*, 2011, vol. 1, no. 1, p. 29-36.
24. Coto, O. Procesamiento e interpretación de datos en estudios de diversidad genética en plantas y microorganismos. IIFT. La Habana, 2008, 33 p.
25. Badenes, M. L. Caracterización e identificación de variedades de albaricoquero por métodos pomológicos y bioquímicos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2001.
26. Becerra, V. y Paredes, M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica de Chile*. 2000, vol. 60, no. 3, p. 270-281.
27. Barta, J.; Curn, V. y Divis, J. Study of Biochemical variability of potato cultivar by soluble proteins, isoesterase and isoperoxidase electrophoretic patterns. *Plant Soil Environ.*, 2003, vol. 49, no. 5, p. 230-236.
28. Tanksley, S. D.; Young, A. H.; Paterson, H. y Bonierbale, M. W. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Biotechnology*, 1989, vol. 126, no. 2, p. 207-212.
29. Iglesias, L. Utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el mejoramiento genético de la papa. *Cultivos Tropicales*, 1994, vol. 15, no. 2, p. 106-121.
30. Frankhan, R.; Ballou, J. D. y Briscoe, D. A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge UK, 2003, 100 p.
31. Pica, A.; Helguera, M.; Salomón, N. y Cabrera, A. II marcadores moleculares, 2006. Capítulo 4. Disponible en: <<http://www.argenbio.org.12pp>>.
32. Becerra, V.; Paredes, M.; Romero A. y Lavín, A. Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*Fragaria chiloensis* L. Duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agríc. Téc.*, 2001, vol. 61, no. 4. p. 21-25.
33. Hussein, T. S.; Tawfikand, A. A. y Khalifa, M. A. Molecular identification and genetic relationships of six Strawberry varieties using ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2008, vol. 10, no. 6, p. 677-680.
34. Brown, A. H. y Clegg, M. T. Isozyme Assessment of Plant Genetic Resources. Isozyme: Current Topics in Biological and Medical Research. Proc 4<sup>th</sup> Inter Cong. *Austing*, 1983, vol. 11, p. 285-295.
35. Manning, K. Change in genes expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 1994, vol. 94, p. 62-68.
36. Davuluri, G. R.; Van Luinen, A.; Fraser, P. D.; Manfredonia, A.; Newman, R.; Burgess, D.; Brummel, D.A.; King, S. R.; Palys, J.; Uhlig, J.; Bramley, P. M.; Pennings, H. M. y Bowler, C. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 7, p. 890-895.
37. Saladié, M.; Matas, J.A.; Isaacson, T.; Jenks, M. A.; Googwin, M.; Niklas, K. J.; Xiaolin, R.; Labavitch, J. M.; Shackel, K. A.; Fernie, A. R.; Lytovchenko, A.; O'Neill, M. A.; Watkins, C. B. y Rose, J. C. K. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, 2007, vol. 144, p. 1012-1028
38. Causse, M.; Chaïb, J.; Lecomte, L.; Buret, M. y Hospital, F. Both additivity and epistasis control the genetic variations for fruit quality traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, vol. 115, p. 429-442.
39. Perkins-Veazie, P. M.; Huber, D. J. y Brecht, J. K. Characterization of ethylene production in developing strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 1995, vol. 17, p. 33-39.
40. Manning, K. Isolation of a set of ripening- related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 1998, vol. 205, p. 622-631.
41. Aharoni, A.; Keizer, L. C. P.; Bouwmester, H. J.; Sun, Z. y Álvarez H. M. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell*, 2000, vol. 12, p. 647- 661.
42. Aharoni, A.; Keizer, L. C. P.; Van den Broeck, H.; Blanco- Portales, C.; Muñoz- Blanco, R. y O'Connell, A. P. Novel insight into vascular, stress, and auxin- dependent and auxin-independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology*, 2002, vol. 129, p. 1019-1031.
43. Salentinj, E. M.; Aharoni, A.; Shaart, J.; Boone, M. y Krens, F. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit firmness. *Physiologia Plantarum*, 2003, vol. 118, p. 571-578.
44. Harrison, E. P. Moqueen-Mason, S. J. y Manning, K. Expression of six expansion genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, p. 1437- 1446.
45. Monfort, A.; Aranzana, M. J.; Hidalgo, M.A.; Sánchez, D. y Arús, P. Phenotyping fruit nutritional quality parameters in the INOTALIS collection of strawberry genotypes. VI International strawberry symposium ISHS. March. Huelva, Spain. 2008.
46. Ogundiwin, E. A.; Peace, C. P.; Nicolet, C.; Rashbrook, C.; Gradziel, T.; Bliss, F.; Parfitt, D. y Crisosto, C. Leucoanthocyanidin dioxygenase gene (PpLDOX): A potential functional marker for cold storage browning in peach. *Tree Genetics and Genomes*, 2008, vol. 4, no. 3, p. 543-554.
47. Bink, M.; Voorrips, R.; Van de Weg, E. y Jansen, H. Statistical tools for QTL mapping in multiple, pedigreed populations. Eucarpia XOO Fruit Section Symposium. September 16-20, Zaragoza, Spain. 2007.
48. Yao, Y. X.; Li, M.; Liu, Z.; Hao, Y. J. y Zha, H. A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering acidity on fruit in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, vol. 173, p. 44-54.

Recibido: 4 de mayo de 2011

Aceptado: 27 de abril de 2012