

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“Functional characterization of strawberry
(*Fragaria × ananassa*) transcription factors
and transcriptional regulator during the
fruit ripening, and genes with
biotechnological interest”**

TESIS DOCTORAL

Francisco Javier Molina Hidalgo

Córdoba, 2016

TITULO: *Functional characterization of strawberry (Fragaria x ananassa) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest*

AUTOR: *Francisco Javier Molina Hidalgo*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**“Functional characterization of strawberry
(*Fragaria × ananassa*) transcription factors
and transcriptional regulator during the
fruit ripening, and genes with
biotechnological interest”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Francisco Javier Molina Hidalgo**,
Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad
de Córdoba con la mención de *Doctorado Internacional*

Córdoba, *Noviembre* de 2016.



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

JUAN MUÑOZ BLANCO, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y ROSARIO BLANCO PORTALES, Investigadora en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

Certificamos

Que FRANCISCO JAVIER MOLINA HIDALGO, Licenciado en Biología por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “**Functional characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest**”.

Revisado el presente trabajo estimamos que reúne todos los requisitos exigidos por la Normativa vigente para optar al grado de Doctor y que puede ser presentado al Tribunal que ha de evaluarlo, por ello autorizamos la defensa de esta Tesis en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 15 de noviembre de 2016.

Dr. D. Juan Muñoz Blanco

Dra. Dña. Rosario Blanco Portales



TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: “Functional characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest”.

DOCTORANDO/A: Francisco Javier Molina Hidalgo

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El Ldo. **Francisco Javier Molina Hidalgo** ha desarrollado en el seno del grupo BIO-278 liderado por el Dr. Juan Muñoz Blanco el trabajo de investigación llamado **“Functional characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest”** que constituye el tema de su Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor con Mención Internacional. Este trabajo de investigación ha sido dirigido y supervisado por el Dr. Juan Muñoz Blanco y la Dra. Rosario Blanco Portales, ambos miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Durante el periodo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis, el Ldo. Molina Hidalgo, además de haber desarrollado un correcto aprendizaje en el laboratorio que la ha permitido adquirir una amplia experiencia en diferentes técnicas de Biología Molecular (mostradas en el apartado de materiales y métodos de la tesis presentada), ha realizado dos estancias cortas (6 meses en total) en los grupos de investigación dirigidos por el Dr. Wilfried Schwab en el grupo: “Biotechnology of Natural Products” del “Center of Life and Food Sciences Weihenstephan” perteneciente a la Universidad Técnica de Munich (TUM); y en el grupo del Dr. Alisdair R. Fernie: “Central Metabolism” del “Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology”, donde se realizaron parte de los análisis presentados en la tesis. Así, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han aislado varios genes, *FaRGlyase1*, *FaNIP1;1*, *FaDOF2* y *FaBOPI*, directamente relacionados con la degradación de pared celular, el transporte de agua y solutos, la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides volátiles, y la regulación de la síntesis de antocianinas y control de la maduración en el fruto de fresa, respectivamente. El hecho de que estos genes estén involucrados en el desarrollo de características tan determinantes en las propiedades finales del fruto de fresa hace este trabajo de investigación especialmente interesante desde el punto de vista biotecnológico y abre las puertas a la obtención de

frutos de fresa mejorados en un futuro próximo. Por otra parte, los resultados incluidos en la tesis y obtenidos por el Ldo. Molina Hidalgo tanto dentro del grupo BIO-278 como en colaboración con grupos de investigación de la Universidad de Málaga, y los grupos del Dr. Schwab y el Dr. Fernie han dado lugar a 6 comunicaciones a congresos, nacionales e internacionales y a 4 publicaciones en revistas indexadas e incluidas en el primer cuartil en el campo de la investigación en plantas superiores, lo que avala su interés para la comunidad científica. Además, el Ldo. Molina Hidalgo también posee 5 manuscritos bajo revisión en la actualidad.

Así, las comunicaciones presentadas a congresos más destacables han sido:

“Transcription factors and regulatory proteins during fruit ripening and plant defense mechanisms against pathogens in strawberry (*Fragaria × ananassa*)”

Molina-Hidalgo FJ, Higuera JJ, Blanco-Portales R, Garrido-Gala J, Martínez-Rivas FJ, Codesido V, Medina-Puche L, Khbou A, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Caballero-Repullo JL, Muñoz-Blanco J.

VII Jornadas de divulgación de la investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. Córdoba, España. Junio, 2016.

“Novel cell wall endohydrolases dramatically involved in the strawberry fruit softening process”

Molina-Hidalgo F.J., Medina-Puche L., Moyano E., Pliego F., Mercado J.A., Rodríguez-Franco A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J.*, Blanco-Portales R.

VII International Strawberry Congress (ISS2012). Beijing, China. Febrero, 2012.

“Strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnolacturonate lyase are key enzyme involved in the degradation of the middle lamella of the cell wall”

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Cañete-Gómez CJ, Rodríguez-Franco A, Caballero-Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

XI Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIRBMP). Segovia, Spain. Junio, 2012.

“Caracterización funcional de un factor de transcripción de tipo bHLH (*FaPRE1*) implicado en el desarrollo y maduración de fresa (*Fragaria × ananassa*)”

Medina-Puche L., **Molina-Hidalgo FJ**, Cañete-Gómez CJ, García-Caparrós N, Moyano-Cañete E, Caballero-Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

XI Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIRBMP). Segovia, Spain. Junio, 2012.

“Caracterización funcional de un gen que codifica un factor de transcripción de tipo DOF de fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*)”

Cañete-Gómez CJ, Magalhaes-Ribeiro GM, Cunha-Gonçalves IC, **Molina-Hidalgo FJ**, Medina-Puche L, García-Caparrós N, Blanco-Portales R, Caballero-Repullo JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Moyano-Cañete E.

XI Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIRBMP). Segovia, Spain. Junio, 2012.

“Novel cell wall endohydrolases dramatically involved in the strawberry fruit softening process”

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Cañete-Gómez CJ, García-Caparrós N, Mérida-Cerro JA, Moyano-Cañete E, Rodríguez-Franco A, Caballero-Repullo JL, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J.

I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación del CeIA3 y II Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. Mayo, 2012

Los artículos de investigación publicados son:

“Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits”

Laura Medina-Puche, Rosario Blanco-Portales, **Francisco Javier Molina-Hidalgo**, Guadalupe Cumplido-Laso, Nicolás García-Caparros, Enriqueta Moyano-Cañete, José Luis Caballero, Juan Muñoz-Blanco† y Antonio Rodríguez Franco (2016). *Functional & Integrative Genomic*, DOI: 10.1007/s1014201605103.

Impact factor: 2.265

“Functional characterization of *FaNIP1;1* gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit”

Francisco Javier Molina-Hidalgo, Laura Medina-Puche, Samuel Gelis, José Ramos, Farzana Sabir, Graça Soveral, Catarina Prista, Raquel Iglesias-Fernández, José Luis Caballero, Rosario Blanco-Portales and Juan Muñoz-Blanco† (2015). *Plant Science*, 238: 198-211

Impact factor: 4.114

“An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles”

Laura Medina-Puche, **Francisco Javier Molina-Hidalgo**, Maaïke R. Boersma, Robert C. Schuurink, Irene López-Vidriero, Roberto Solano, José-Manuel Franco-Zorrilla, José Luis Caballero, Rosario Blanco-Portales and Juan Muñoz-Blanco† (2015). *Plant Physiology* 168: 598-614

Impact factor: 6.841

“The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae”

FJ Molina-Hidalgo, AR Franco, C Villatoro, L Medina-Puche, JA Mercado, MA Hidalgo, A Monfort, JL Caballero, J Muñoz-Blanco† and R Blanco-Portales (2013). *Journal of Experimental Botany*, 64(6): 1471-1483.

Impact factor: 5.242

Y los artículos de investigación que se encuentran actualmente en fase de escritura son:

“The strawberry fruit FaDOF2 transcription factor interacts with FaEOBII in regulating eugenol production through FaEGS2”

Francisco Javier Molina-Hidalgo, Laura Medina-Puche, Carlos Cañete-Gómez, José Manuel Franco-Zorrilla, Irene López-Vidriero, Roberto Solano, José Luis Caballero, Antonio Rodríguez-Franco, Rosario Blanco-Portales, Juan Muñoz-Blanco† y Enriqueta Moyano (2016)

“*FaBOPI* encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that regulates the ripening acting as co-activator by controlling the transcriptional regulation”

Francisco Javier Molina-Hidalgo, Laura Medina-Puche, Takayki Tohge, José Luis Caballero, Antonio Rodríguez Franco, Alisdair R Fernie, Rosario Blanco-Portales y Juan Muñoz-Blanco[†] (2016).

Biochemical characterization of *FaCXE2*, a carboxylesterase from strawberry expressed along the fruit ripening”

Francisco Javier Molina-Hidalgo, Laura Medina-Puche, José Luis Caballero, Wilfried Schwab, Rosario Blanco-Portales y Juan Muñoz-Blanco[†] (2016).

“Functional characterization of *FabHLH75*, a bHLH transcription factor expressed during the ripening in strawberry fruit”

Francisco Javier Molina-Hidalgo, Laura Medina-Puche, José Luis Caballero, Rosario Blanco-Portales y Juan Muñoz-Blanco[†] (2016).

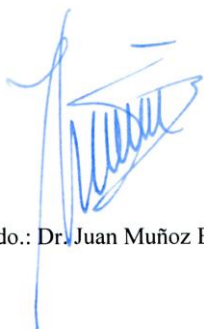
“An PRE-like regulator involved in cell size and shape in strawberry”

Laura Medina-Puche, **Francisco Javier Molina-Hidalgo**, Juan Antonio García Gago, Jose Ángel Mercado Carmona, Nicolás García-Caparrós, José Luis Caballero-Repullo, Rosario Blanco-Portales, Juan Muñoz-Blanco[†] (2016).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, 15 de noviembre de 2016

Firma del/de los director/es



Fdo.: Dr. Juan Muñoz Blanco



Fdo.: Dra. Rosario Blanco Portales

A mis padres, José y Purificación

*Where nature finishes producing its own species, man begins,
using natural things and with the help of this nature, to create
an infinity of species.*

Leonardo da Vinci

AGRADECIMIENTOS

Ahora que termina esta etapa, quiero agradecer con estas palabras a todas las personas con las que he tenido el placer de compartir este tiempo, que me han ayudado a crecer en todos los aspectos, y que con su apoyo y dedicación me han ayudado al alcanzar este objetivo.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincera gratitud a Juan por la oportunidad de haber podido realizar esta tesis en su grupo de investigación, y con ella, empezar mi carrera investigadora. A mis directores de tesis, Juan y Charo, por su dedicación y apoyo durante estos años.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio y todos los que han pasado por él. A José Luis, Enri y Antonio, por sus consejos, que me han ayudado a resolver más de una duda durante mi investigación. A Fran, Pepe, Nico, Ayman, Félix, José Javier, y Casimiro, que no es del grupo, pero es amigo, gracias por vuestra ayuda y amistad. He aprendido mucho de vosotros. Y a Laura, mi “compi” Laura, un gran apoyo y amiga. Contigo he compartido todos los momentos, los buenos y los malos. Deseo que todo tu esfuerzo y dedicación tengan pronto su recompensa.

Quisiera también dar las gracias a los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, que siempre me han prestado su ayuda cada vez que la he necesitado. Especialmente a Jesús Jorrín, del que a diario tanto aprendo. Y tampoco quisiera olvidarme de Conchi, Inés y Susana. Mil gracias.

Deseo también agradecer al Dr. Wilfried Schwab, de la Universidad Técnica de Múnich (Freising, Alemania) y al Dr. Alidair Fernie, del Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas (Postdam, Alemania). Gracias por su hospitalidad, poner a mi disposición cuanto he necesitado en sendas estancias.

A mis amigos, Sergio, Carlos, Pedro, Pepe, Iván, Raúl, Antonio, porque me han escuchado y animado siempre que lo he necesitado, gracias por compartir momentos que me hicieron recargar las pilas para poder seguir adelante. Son muchos los recuerdos y muchos más que nos quedan por vivir. Gracias por vuestra amistad y apoyo incondicional.

De forma muy especial tengo que agradecer a mi familia por apoyarme en todo momento a lo largo de mi doctorado. A mis padres, José y Puri, por haberme transmitido esos valores que me han ayudado a crecer tanto personal como profesionalmente. Gracias por enseñarme a ser constante y responsable. Este trabajo es

solo una pequeña muestra de todo el esfuerzo, sacrificio, entrega y dedicación que ellos han depositado en mí. A mis hermanos, José Luis y María, gracias por su preocupación, por querer siempre lo mejor para mí. A mi abuelo, con el que me hubiera encantado poder compartir este momento.

Por supuesto, a Elena. Tú has sido la razón para seguir, quien ha estado siempre a mi lado, quien me ha dado fuerza en momentos de debilidad, quien ha disfrutado junto a mí de los buenos momentos, quien me ha dado su apoyo incondicional.

Por último, gracias a todas y cada una de las personas que, en algún momento, han compartido esta andanza conmigo. Sin vuestra ayuda no hubiera sido posible.

TABLE OF CONTENTS

Abreviaturas/Abbreviations	xix
Summary	27
Resumen	35
Summary General Introduction	43
Introducción	53
1. La planta de fresa: generalidades	55
1.1. Origen, especiación y evolución	
1.2. Citología e interfertilidad	
1.3. Análisis filogenético	
2. Morfología del fruto de fresa	58
2.1. Los aquenios	
2.2. El receptáculo	
3. Composición del fruto de fresa	62
4. Fisiología del fruto de fresa	64
4.1. Cambios macroscópicos	
4.1.1. Crecimiento	
4.1.2. Elongación	
4.1.3. Maduración	
4.2. Cambios microscópicos	
4.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor	
<i>Carbohidratos</i>	
<i>Ácidos orgánicos</i>	
<i>Compuestos fenólicos</i>	
<i>Compuestos volátiles</i>	
4.2.2. Metabolismo de los fenilpropanoides: aparición del color	
4.3. Respiración	
4.4. Choque oxidativo	
5. Regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa	87
5.1. Auxinas	
5.2. Giberelinas y citoquininas	
5.3. Ácido abscísico	
5.4. Etileno	
5.5. Brasinoesteroides	
6. Control de la floración	96
7. Expresión génica durante el desarrollo y la maduración del fruto de fresa	98
8. Genes implicados en la mejora de fresa	104
8.1. Mejora de la planta de fresa frente a plagas y enfermedades	
8.1.1. Resistencia a agentes abióticos	
8.1.2. Resistencia a agentes bióticos	
8.2. Mejora de la floración y fructificación de la planta de fresa	
8.3. Mejora de la calidad del fruto de fresa mediante la modificación de sus propiedades organolépticas	
8.3.1. Manipulación del proceso de reblandecimiento	

8.3.2. Mejora del sabor	
8.3.3. Mejora del color	
9. Alérgenos de la fresa	118
10. Importancia económica del fruto de fresa	119
Objectives	149
Summary General Methods	153
Materiales y Métodos	173
I. MATERIALES	175
I.1. Material químico	175
I.1.1. Productos químicos	
I.1.2. Antibióticos utilizados	
I.1.3. Kits de biología molecular	
I.2. Material biológico	181
I.2.1. Material vegetal	
I.2.2. Estirpes bacterianas	
I.2.3. Estirpes de levaduras	
I.2.4. Vectores de clonación en <i>E. coli</i> .	
I.2.5 Vectores de expresión de proteínas	
I.2.6. Vectores binarios	
II. MÉTODOS	196
II.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	196
II.1.1. Extracción de ARN	
II.1.2. Extracción de ADN	
II.2. Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos mediante electroforesis	198
II.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos	
II.2.2. Separación electroforética de ácidos nucleicos	
II.3. Manipulación de moléculas de ADN	200
II.3.1 Purificación de fragmentos de ADN	
II.3.2. Concentración de muestras de ADN	
II.3.3. Digestión de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción	
II.3.4. Ligación de moléculas de ADN	
II.3.5. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN	
II.3.6. Secuenciación	
II.4. Obtención de células competentes y transformación de bacterias	207
II.4.1. Preparación de células competentes permanentes de <i>E. coli</i> DH5 α BL21	
II.4.2. Transformación de células de <i>E. coli</i> químicamente competentes	
II.4.3. Preparación de células competentes permantes de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404, GV3101 y AGL0.	
II.4.4. Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> químicamente competentes	
II.4.5. Selección de transformantes bacterianos positivos	
II.4.6. Identificación de transformantes positivos	
II.5. Obtención de células competentes y transformación de levaduras	211
II.5.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (protocolo a pequeña escala).	
II.5.2. Obtención de células competentes y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (protocolo a gran escala).	
II.5.3. Selección por aminoácidos	
II.6. Estudios de expresión génica	212

II.6.1. Tratamiento del ARN con <i>DNaseI</i>	
II.6.2. Comprobación de la pureza del ARN total	
II.6.3. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	
II.7. Generación y análisis de <i>microarray</i>	219
II.7.1. Anotación de secuencias a partir de una librería de ESTs	
II.8. Extracción de compuestos volátiles, pigmentos y hormonas del fruto de fresa	220
II.8.1. Extracción de compuestos volátiles	
II.8.2. Extracción de antocianinas y clorofila	
II.8.3. Extracción de ABA	
II.9. Generación de plantas transgénicas	223
II.9.1. Introducción a la metodología <i>Gateway</i>	
II.9.2. Principios básicos de la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	
II.9.3. Transformación estable de plantas de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Chandler”	
II.9.4. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Elsanta”.	
II.9.5. Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> a través de agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i> GV3101.	
II.10. Escrutinio de interacción mediante doble híbrido en levadura	234
II.10.1. Ensayos de auto-activación	
II.10.2. Identificación de transformantes diploides positivos de levadura	
II.11. Purificación de proteínas y determinación de motivos de unión al ADN	236
II.12. Ensayos histológicos	237
II.12.1. Recolección y fijación del material biológico	
II.12.2. Inclusión en parafina	
II.12.3. Inclusión en la resina epoxi Epon	
II.12.4. Obtención de bloques y cortes histológicos	
II.12.5. Montaje de los cortes histológicos	
II.12.6. Contraste de la secciones	
II.12.7. Tinciones histológicas	
II.13. Ensayos de transporte de agua y solutos en levadura recombinante sobreexpresando el gen <i>FaNIP1;1</i>	242
II.13.1. Clonaje del ADNc completo del gen <i>FaNIP1;1</i> en los plásmidos de levaduras pYES2 y pUG35	
II.13.2. Ensayos de crecimiento de las levaduras bajo sustratos atípicos	
II.13.3. Condiciones de crecimiento y ensayo de stopped-flow	
II.13.4. Evaluación del coeficiente de permeabilidad osmótica (<i>P_f</i>) y energía de activación (<i>E_a</i>) para el transporte de agua	
II.14. Determinación de un QTL de firmeza. Análisis de genotipo	244
II.15. Determinación del contenido de agua de los frutos. Curva de estatus hídrico	245
II.16. Análisis estadístico de los datos	246
III. Bibliografía	247
CHAPTER 1	
The strawberry (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (<i>FaRGLyase1</i>) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell walls middle lamellae	251
Abstract	253

Introduction	253
Results	256
Sequence analysis of the <i>FaRGlyase1</i> gene and protein	
The spatio-temporal expression pattern indicates that <i>FaRGlyase1</i> is a receptacle-specific gene involved in ripening	
Hormonal regulation of the <i>FaRGLyase1</i> gene	
Histological changes produced by the transient silencing of <i>FaRGlyase1</i> expression through agroinfiltration with RNAi constructs	
Firmness QTL linked to the <i>FaRGLyase1</i> gene	
Discussion	266
<i>FaRGLyase1</i> gene is highly expressed when softening of ripe fruit receptacles occurs	
<i>FaRGLyase1</i> gene expression is regulated positively by ABA and negatively by auxins	
FaRGlyase1 protein is involved in the degradation of cell-wall middle lamellae in fruit receptacle	
References	271

CHAPTER 2

Functional characterization of <i>FaNIP1;1</i> gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit	275
---	-----

Abstract	277
Introduction	277
Results	279
Structural features of the amino acid deduced sequence of <i>FaNIP1;1</i> gene	
Spatio-temporal expression profile of <i>FaNIP1;1</i> gene	
<i>FaNIP1;1</i> gene expression is hormonally regulated by auxins and ABA	
<i>FaNIP1;1</i> gene is up-regulated under conditions of water deficit and in presence of mannitol	
Subcellular localization of the FaNIP1;1 protein	
Water transport activity in recombinant YSH1172 strain yeast cells transformed with pYES2::FaNIP1;1	
Functional studies of FaNIP1;1 protein using yeast as a heterologous experimental system	
Transport of glycerol, H ₂ O ₂ , and boron by FaNIP1,1 aquaporin	
Discussion	292
FaNIP1;1 belongs to a NIP-I subgroup	
<i>FaNIP1;1</i> is a ripening - and drought-related gene and is regulated by ABA	
Auxins regulate <i>FaNIP1;1</i> expression	
FaNIP1;1 is located in plasma membrane	
FaNIP1;1 transports water and some small non-ionic solute molecules	
References	298

CHAPTER 3

The strawberry fruit FaDOF2 transcription factor interacts with FaEOBII in regulating eugenol production through FaEGS2	305
---	-----

Abstract	307
Introduction	308
Results	310

Transcriptomic analyses show that <i>FaDOF2</i> is a ripening-related gene	
Isolation and sequence analysis of the <i>FaDOF2</i> gene and protein___	
FaDOF2 protein is located in the nucleus	
High throughput transcriptomic analysis shows that FaDOF2 is a key regulator of the volatile benzenoid/phenylpropanoid pathway	
FaDOF2 binds to DOF-binding sequence in vitro	
FaDOF2 interacts with FaEOBII, a R2R3 MYB transcription factor that regulates eugenol biosynthesis in red-ripe fruit receptacle	
<i>FaDOF2</i> expression is ripening-related and is strongly expressed in fruit receptacles and petals and correlates with eugenol production in both tissues.	
Expression of FaDOF2 gene is hormonally regulated throughout receptacle fruit growth and ripening	
Discussion_____	322
FaDOF2 regulates expression of two key genes related to eugenol biosynthesis in strawberry fruit receptacles	
FaDOF2 physically interacts with FaEOBII a R2R3 MYB TF	
<i>FaDOF2</i> expression is ripening-related and hormonally regulated___	
Conclusion_____	325
References_____	326

CHAPTER 4

<i>FaBOP1</i> encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that regulates the ripening acting as co-activator by controlling the transcriptional regulation_____	333
Abstract_____	335
Introduction_____	336
Results_____	338
Structural features of the amino acid deduced sequence of <i>FaBOP1</i> gene	
The <i>FaBOP1</i> expression is ripening-related, preferentially expressed in fruit receptacle and hormonally regulated	
Subcellular localization of the FaBOP1 protein_	
FaBOP1 acts as co- regulator of the expression of ripening related genes related with the secondary metabolism	
In a Y2H system, FaBOP1 interacts with FaMYB10, a R2R3 MYB transcription factor which is a major regulator of the anthocyanin production in fruit receptacle_____	
<i>FaBOP1</i> down-regulation changes metabolite composition in strawberry fruit receptacle	
Discussion_____	350
<i>FaBOP1</i> expression is ripening-related and hormonally regulated and co-regulates with the expression of those genes that are related to the organoleptic properties of strawberry fruit receptacle	
FaBOP1 physically interacts with FaMYB10 TF	
FaBOP1 regulates expression of <i>FaMYB10</i> TF and other genes related to F/P biosynthesis in strawberry fruit receptacles	
Conclusion_____	353
References_____	354
Conclusions_____	351
Additional files_____	365

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
1-MCP	1-metilciclopropeno / 1-methylcyclopropene	
1-NAAm	1-naftalenacetamida / 1-naphthaleneacetamide	
4CL	<i>p</i> -cumarato:CoA ligasa / <i>p</i> -coumarate:CoA ligase	<i>Fa4CL</i>
aa	aminoácido / amino acid	
AAT	alcohol acil transferasa / alcohol acyltransferase	<i>FaAAT1; FaAAT2; FaSAAT</i>
ABA	ácido abscísico / abscisic acid	
ABP1	proteína de unión a auxinas 1 / auxin-binding protein 1	<i>FaABP1</i>
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa / 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	
ACO	ACC oxidasa / ACC oxidase	<i>FaACO1</i>
ADH	alcohol deshidrogenasa / alcohol dehydrogenase	
ADN/DNA	ácido desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid	
ADNasa/DNasa	desoxirribonucleasa / deoxyribonuclease	
ADNc/cDNA	ácido dexorribonucleico copia / deoxyribonucleic acid copy	
ADNcp/cpDNA	ácido desoxirribonucleico del cloroplasto / chloroplast deoxyribonucleic acid	
ADNcs/ssDNA	ácido desoxirribonucleico de cadena simple / single strand deoxyribonucleic acid	
ADNdc/dsDNA	ácido desoxirribonucleico de doble cadena / double strand deoxyribonucleic acid	
AFP	proteínas anticongelantes de peces antárticos / antarctic fish antifreeze proteins	<i>AFP</i>
AG	AGAMOUS	<i>FaAG1</i>
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa / ADP-glucose pyrophosphorylase	
AKR	aldo ceto reductasa / aldo-keto reductase	
ANR	antocianidin reductasa / anthocyanidin reductase	<i>FaANR</i>
ANS/LDOX	antocianidin sintasa; leucoantocianidin dioxigenasa / anthocyanidin synthase; leucoantocianidin dioxygenase	<i>FaANS</i>
ARN	ácido ribonucleico / ribonucleic acid	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
ARNasa/RNAsa	ribonucleasa / ribonuclease	
ARNi/RNAi	ácido ribonucleico interferente / interfering ribonucleic acid	
ARNm/RNA_m	ácido ribonucleico mensajero / messenger ribonucleic acid	
ARNr/RNA_r	ácido ribonucleico ribosómico / ribosomal ribonucleic acid	
BA	N ⁶ -benciladenina / N ⁶ -benzyladenine	
bHLH	basic helix-loop-helix	
BL	brasinólido / brassinolide	
BrEt	bromuro de etidio / ethidium bromide	
BRs	brasinoesteroides / brassinosteroids	
BSA	seroalbúmina bovina / bovine serum albumin	
C4H	ácido cinámico 4-hidroxilasa / cinnamic acid 4-hydroxylase	<i>FaC4H</i>
CAD	cinamil alcohol deshidrogenasa / cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Facad; FaCAD1</i>
CBF1	factor de unión CRT/DRE / CRT/DRE binding factor 1	<i>FaCBF1</i>
CCR	cinamoil CoA-reductasa / cinnamoyl CoA reductase	<i>Faccr; FaCCR</i>
CDPK	proteína quinasa calcio-dependiente / calcium-dependent protein kinase	<i>FaCDPK1</i>
Cel	celulasa / cellulase	<i>FaCell</i>
CHI	chalcona isomerasa / chalcone isomerase	<i>FaCHI</i>
CHR	chalcona reductasa / chalcone reductase	<i>FaCHR</i>
CHS	chalcona sintasa / chalcone synthase	<i>FaCHS</i>
CIAP	fosfatasa alcalina / alkaline phosphatase	
CoA	coenzima A / coenzyme A	
COV / VOC	compuestos orgánicos volátiles / volatile organic compounds	
CS	catasterona / catasterone	
Ct	ciclo umbral / threshold cycle	
cv.	cultivar	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
Da	Dalton	
DEPC	dietil pirocarbonato / diethyl pyrocarbonate	
DFR	dihidroflavonol reductasa / dihydroflavonol reductase	<i>FaDFR</i>
D-Glu-6-P	D-glucosa-6-fosfato / D-glucose-6-phosphate	
DMMF	2,5-dietil-4-metoxi-3(2H)-furanona / 2,5-diethyl-4-methoxy-3 (2H)-furanone	
DMSO	dimetil sulfóxido / dimethyl sulfoxide	
dNTPs	desoxirribonucleótidos / deoxyribonucleotides	
DO	densidad óptica /	
DTT	ditiotreitól / dithiothreitol	
EBGs	genes tempranos reguladores de la biosíntesis del metabolismo de flavonoides/fenilpropanoides / early regulated biosynthesis genes	
EDTA-Na₂	ácido etilendiamino tetracético (sal disódica) / ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt)	
EG	endoglucanasa / endoglucanase	<i>FaEG</i>
ERF	elementos de respuesta al etileno / ethylene response elements	
ESTs	secuencia de ADNc expresada / expressed sequence tag	
EtOH	etanol / ethanol	
Etr2	receptores de etileno de tipo-II / ethylene receptor type-II	<i>FaEtr1; FaETr2</i>
EXP	expansina / expansin	<i>FaExp</i>
F3H	flavonoide 3-hidroxilasa / flavonoid 3-hydroxylase	<i>FaF3H</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Food and Agriculture Organization of the United Nations	
Fcor	Fragaria regulada por frío / Fragaria cold-regulated	<i>Fcor1, Fcor2</i>
FDP	farnesil difosfato / farnesyl diphosphate	
Fig.	figura / figure	
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente / fluorescence <i>in situ</i> hybridization	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
FK	fructoquinasa / fructokinase	
FLS	flavonol sintasa / flavonol synthase	
FT/TF	factor de transcripción / transcription factor	
GalUA	ácido galacturónico / galacturonic acid	
GAs	giberelinas / gibberellins	
GAST	Transcrito estimulado por GA / GA-stimulated transcript	<i>FaGAST1; FaGAST2</i>
GC-MS	cromatografía de gases-espectrometría de masas / gas chromatography-mass spectrometry	
GFP	proteína verde fluorescente / green fluorescent protein	
GST	glutación S-transferasa / glutathione S-transferase	
GUS	β -glucuronidasa / β -glucuronidase	
HDMF	4-hydroxy-2,5-dimetil-3(2H)-furanona / 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H)-furanone (furanol)	
HGA	homogalacturonanos / homogalacturonan	
HK	hexoquinasa / hexokinase	
HPLC-MS	cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas / high performance liquid chromatography-mass spectrometry	
HSP	proteínas de choque térmico / heat shock protein	<i>HSP</i>
HyPRP	híbrido proteína rica en prolina / hybrid proline-rich protein	<i>FaHyPRP</i>
IAA	ácido 3-indol acético / 3-indole acetic acid	
IASI	invertasa ácida soluble / soluble acid invertase	
IgE	Inmunoglobulina E / immunoglobulin E	
IPTG	isopropil- β -D-galactósido / isopropyl- β -D-galactoside	
ITS	espaciadores de transcripción interna / internal transcribed spacer	
Kb	kilobase	
LAGs	genes tardíos reguladores de la biosíntesis del metabolismo de flavonoides/fenilpropanoides / late-regulated biosynthesis genes	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
LB	medio de cultivo Luria-Bertani / culture medium Luria-Bertani	
LC-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas / liquid chromatography–mass spectrometry	
LTP	proteína de transferencia de lípidos / lipid transfer protein	<i>Faltp; FaLTP</i>
MBP	proteína de unión a la maltosa / maltose binding protein	
MMA	Sales de Murashige y Skoog, morfolina ácido etanosulfónico y acetosiryngona / Murashige and Skoog salts, morpholine ethanesulfonic acid and acetosiryngone	
MS	medio de cultivo Murashige y Skoog / culture medium Murashige and Skoog	
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida / reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología / National Center for Biotechnology Information	
NCED	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa / 9- <i>cis</i> -dioxygenase epoxicarotenoide	<i>FaNCED1</i>
NDGA	ácido nordihidroguaiarético / nordihydroguaiaretic acid	
NES1	nerolidol sintasa 1 / nerolidol synthase 1	<i>FaNES1</i>
NPR	non expressor of pathogenesis related	
nptII	neomicina fosfotransferasa II / neomycin phosphotransferase II	
OGA	derivados pectínicos oligogalacturónidos / derivatives pectinic oligogalacturonides	
OLP	proteína de tipo osmotina / osmotin like protein	<i>OLP2</i>
OMT	O-metil transferasa / O-methyl transferase	<i>FaOMT</i>
ORF	marco abierto de lectura / open reading frame	
PA; PAs	proantocianidinas / proanthocyanidins	
PAC	paclobutrazol	
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida / polyacrylamide gel electrophoresis	
PAL	fenilalanina amonio-liasa / phenylalanine ammonia lyase	<i>FaPAL</i>
PAS	Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff / periodic acid-Schiff	
pb/bp	pares de bases / base pairs	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
PcF	péptido fitotóxico extracelular / extracellular phytotoxic peptide	
PCR	reacción en cadena de la polimerasa / chain reaction polymerase	
PDC	piruvato descarboxilasa / pyruvate decarboxylase	<i>FaPDC1</i>
PE	pectín metilesterasa / pectin methylesterase	<i>FaPE1-FaPE4</i>
PEG	polietilenglicol / polyethylene glycol	
PG	poligalacturonasa / polygalacturonase	<i>FaPG</i>
PGIP	polygalacturonase-inhibiting protein / polygalacturonase-inhibiting protein	<i>PGIP</i>
pI	punto isoeléctrico / isoelectric point	
PINS	sintasa pineno / pinene synthase	<i>FvPINS</i>
PIP	proteínas intrínsecas de la membrana plasmática / plasma membrane intrinsic proteins	<i>FaPIP1;1, FaPIP2;1</i>
PL	pectato liasa / pectate lyase	<i>FaPL</i>
PMSR	metionina sulfóxido reductasa / methionine sulfoxide reductase	<i>Fapmsr; FaPMSR</i>
PRs	genes relacionados con la patogénesis / pathogenesis-related genes	<i>FaPR</i>
PRE	resistente a paclobutrazol / paclobutrazol resistant	<i>FaPRE1</i>
PRX	peroxidasa / peroxidase	<i>FaPRX27</i>
QR	quinona reductasa / quinone reductase	<i>FaQR</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real / quantitative real time PCR	
QTL	locus de un carácter cuantitativo / quantitative trait locus	
RACE	amplificación rápida de extremos de ADNc / rapid amplification of cDNA ends	
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar / Randomly Amplified Polymorphic DNA	
RGA	genes análogos a la resistencia / Resistance Gene Analogs	
RG-I	ramnogalacturonanos I / rhamnogalacturonan I	
RG-II	ramnogalacturonanos II / rhamnogalacturonan II	
RGlyase	ramnogalacturonato liasa / rhamnogalacturonate lyase	<i>FaRGlyase1</i>
ROS	especies reactivas de oxígeno / reactive oxygen species	

(table continues on following page)

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS		
rpm	revoluciones por minuto / revolutions per minute	
RT	reacción de retrotranscripción / reverse transcription reaction	
S6PDH	sorbitol deshidrogenasa-6-fosfato / sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	<i>FaS6PDH</i>
SA	ácido salicílico; salicilato / salicylic acid; salicylate	
SCAI	Servicio Central de Apoyo a la Investigación / Central Service for Research Support	
SCAR	regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas / Sequence Characterized Amplified Region	
SDH	sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente / sorbitol dehydrogenase NAD-dependent	<i>FaSDH</i>
SDS	duodecil sulfato sódico / sodium dodecyl sulfate	
SFL	locus de floración estacional / seasonal flowering locus	
SKDH	shikimato deshidrogenasa / shikimate dehydrogenase	
sp.	especie / species	
spp.	subespecie / subspecies	
SPS	sacarosa fosfato sintasa / sucrose phosphate synthase	
SS	sacarosa sintasa / sucrose synthase	
TBE	tampón Tris-bórico-EDTA-Na ₂ / Tris-borate-EDTA-Na ₂	
T-DNA	ADN transferido / transfer DNA	
TE	tampón Tris-EDTA-Na ₂ / Tris-EDTA-Na ₂	
TLC	cromatografía de capa fina / thin layer chromatography	
Tm	temperatura de fusión / melting temperature	
UFGT	UDP-glucosa:flavonoide-3-O-glucosiltransferasa / UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase	<i>FaUFGT</i>
UV	radiación ultravioleta / ultraviolet radiation	
wt	planta silvestre / wild type	
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactósido / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactoside	
Xyl	xilosidasa / xylosidase	<i>FaXyl</i>

SUMMARY

SUMMARY

SUMMARY**“Functional characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest”**

Along the development of this thesis, I have studied the transcriptomic changes that occur in the receptacle of the strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) during development and ripening using an oligo microarray platform. This analysis allowed selecting several target genes with biotechnological importance potentially involved in the process of fruit ripening, playing significant roles in various physiological processes such as cell wall degradation, water and solute transport, regulation of volatile compounds and regulation of the anthocyanins that contribute to modulate the final organoleptic properties of the fruit.

One of the selected genes, *FaRGlyase1*, displayed significant sequence homology with putative rhamnogalacturonan lyases from higher plants. In strawberries, the cortical parenchyma cells middle lamellae is extensively degraded throughout the ripening process, and they subsequently appear to be separated by a considerable intercellular space with little cell-to-cell contact area. Three kinds of pectins can be distinguished in plant cell walls: homogalacturonan (HGA), rhamnogalacturonan I (RG-I), and rhamnogalacturonan II (RG-II). In cell walls middle lamellae, HGA, a linear backbone of 1,4-linked galacturonic acid is predominant. Rhamnogalacturonan-degrading enzymes such as RG-hydrolases and RG-lyases (RGases) were first identified in several fungi. These enzymes digest the main RG-I chain.

In this work, we have observed that *FaRGlyase1* could play an important role in the fruit ripening-related softening process that reduces strawberry firmness and post-harvest life. Expression of this *FaRGlyase1* occurred mainly in the receptacle concurrently with ripening, and it was positively regulated by ABA and negatively by auxins.

On the other hand, *FaRGLyase1* gene expression was transiently silenced by injecting live *Agrobacterium* cells harboring RNAi constructs into fruit receptacles. The light and electron microscopy analyses of these transiently silenced fruits revealed that this gene is involved in the degradation of pectins present in the middle lamella region between parenchymatic cells.

In addition, genetic linkage association analyses in a strawberry-segregating population have shown that *FaRGLyase1* is linked to a QTL linkage group related to fruit hardness and firmness. Results show that *FaRGLyase1* could play an important role in the fruit ripening-related softening process that reduces strawberry firmness and post-harvest life.

The next gene selected to be studied was an aquaporin, *FaNIP1;1*, that is strongly up-regulated in ripened fruits and putatively encodes an aquaporin type NOD26-like intrinsic protein (NIP). Aquaporins belong to the family of integral membrane channel proteins known as Major Intrinsic Proteins (MIPs). MIPs are particularly abundant in plants and exhibit high multiplicity and diversity, which is likely due to the necessity of a fine-tuned water control that allows the plant to adapt to changing environmental conditions.

In the strawberry fruit, water movements are crucial since they allow for the rapid expansion of fruit. It has been reported that berry size correlates positively with the amount of irrigation water applied during flowering and fruit development. Water balances are always accompanied by water movements across biological membranes by means of diffusion or through water channels.

In this work, we report that the *FaNIP1;1* protein could play an important role in the control of the strawberry fruit hydration. The analysis by qRT-PCR of *FaNIP1;1* showed that this gene is mainly expressed in fruit receptacle and has a ripening-related expression pattern that was accompanied by an increase in both the abscisic acid and water content of the receptacle throughout fruit ripening. Moreover, *FaNIP1;1* was induced in situations of water deficit. Additionally, we show that *FaNIP1;1* expression was positively regulated by abscisic acid and negatively regulated by auxins.

The water transport capacity of FaNIP1;1 was determined by a stopped-flow spectroscopy in yeast over-expressing *FaNIP1;1*. Glycerol, H₂O₂ and boron transport were also demonstrated in yeast. On the other hand, GFP-FaNIP1;1 fusion protein was located in plasma membrane.

In conclusion, *FaNIP1;1* seems to play an important role increasing the plasma membrane permeability, that allows the water accumulation in the strawberry fruit receptacle throughout the ripening process.

Transcription factors (TFs) are essential for gene expression regulation in plants. However, knowledge related to the regulatory role played by different TFs along the strawberry fruit ripening process is scarce. For that, other of the selected genes was a transcription factor belonging to the DOF family, FaDOF2, which is involved in regulating the production of phenylpropanoid volatiles. DOF transcription factors (*DOF-TFs*) constitute one of the multigene families of plant-specific TFs that physiologically regulate many complex and specific plant processes or metabolic pathways. I present molecular and physiological studies showing that FaDOF2 is involved in the regulation of endogenous eugenol production, a volatile phenylpropanoid in ripe fruit receptacles.

The *FaDOF2* expression was ripening-related and fruit receptacle-specific, although high expression values were also found in petals. This *FaDOF2* expression pattern correlated with eugenol content, a phenylpropanoid volatile, in both fruit receptacle and petals. The *FaDOF2* expression was repressed by auxins, and activated by abscisic acid (ABA) during the fruit development and ripening process, respectively.

When the *FaDOF2* expression was silenced in ripe strawberry receptacles, the expression of *FaEOBII* and *FaEGS2*, two key genes involved in eugenol production, were down-regulated. These fruits showed a concomitant decrease in eugenol content, which confirmed that FaDOF2 is a transcription factor involved in eugenol production in ripe fruit receptacles.

SUMMARY

By using the yeast two-hybrid system, we have demonstrated that FaDOF2 interacts with FaEOBII, a eugenol production regulator reported in a previous study. Our results indicate that the mutual interaction between *FaEOBII* and *FaDOF2* would determine a fine-tuning of the expression of key genes that are responsible for eugenol production. Additionally, *FaEOBII* expression, but not *FaDOF2*, was under control of FaMYB10, a master R2R3 MYB transcription factor regulating both early and late biosynthetic genes from the flavonoid/phenylpropanoid pathway.

These results provide evidences that *FaDOF2* plays a subsidiary regulatory role with *FaEOBII* of the expression of those structural genes that control eugenol production. Taken together, our results provide new insight in regulation of the volatile phenylpropanoid pathway in ripe strawberry receptacles.

The next gene selected to be studied was a transcription regulator belonging to the BTB-ankyrins proteins of BLADE-ON-PETIOLE (BOP) class, *FaBOP1*. According to its aminoacidic sequence, FaBOP1 contains a BTB/POZ domain (for Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac/POX virus and Zinc finger) at the N-terminus, as well as four ankyrin motifs located near the C-terminus. This two conserved domain has been previously proposed as protein-protein interaction motifs.

Ripening in strawberry fruit is a complex process which carries out several changes in flavor, color taste and softening. The regulatory network that supports these molecular and metabolic changes that occur along the ripening has been scarcely studied.

High-throughput transcriptomic analyses allowed us to identify this ripening induced gene whose expression was quite fruit specific and hormonally regulated, in an antagonist way, by auxins and ABA. BTB-ankryin proteins are plant-specific transcriptional co-activators.

The *FaBOP1* expression was silenced in ripe strawberry receptacles. As phenotypic effect of gene silencing, we observed a lack of colour, compared with the control receptacles. The flavonoid/phenylpropanoid pathway structural genes were down-regulated in transgenic *FaBOP1* silenced fruits. This was corroborated by metabolite comparison between both control and transgenic fruits.

By using the yeast two-hybrid system, we have demonstrated that FaBOP1 interacts with FaMYB10, a master R2R3 MYB transcription factor regulating both early and late biosynthetic genes from the flavonoid/phenylpropanoid pathway.

Our study has revealed the role for the BOP-like coactivator FaBOP1, which bind to the transcription factor R2R3-MYB10 and in this way, to regulate the F/P biosynthesis. The dramatic effect in the phenotype and metabolic profile by the transient silencing clearly shows the importance of the role played, as a co-activator, by FaBOP1 in strawberry fruit receptacle. Thus, the most important molecular and metabolic changes associated with ripening, are affected by *FaBOP1* silencing.

SUMMARY

RESUMEN

RESUMEN**“Caracterización funcional de factores de transcripción y reguladores transcripcionales de fresa (*Fragaria × ananassa*) durante la maduración del fruto, y genes con interés biotecnológico”**

A lo largo del desarrollo de esta Tesis se han estudiado los cambios transcriptómicos que ocurren en el receptáculo del fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*) durante su desarrollo y maduración usando una plataforma de microarrays de oligos. Este análisis permitió seleccionar varios genes de interés biotecnológico potencialmente implicados en el proceso de maduración, jugando papeles significativos en diversos procesos fisiológicos tales como la degradación de la pared celular, el transporte de agua y solutos, la regulación de compuestos volátiles y la regulación de la síntesis de antocianinas, que contribuyen en la modulación de las propiedades organolépticas finales del fruto.

Uno de los genes seleccionados, *FaRGlyase1*, mostraba homología de secuencia significativa con posibles liasas de ramnogalacturonanos de plantas superiores. En fresa, la lámina media de las células del parénquima cortical es ampliamente degradada a lo largo del proceso de maduración, y consiguientemente estas células se separan por un considerable espacio intercelular con poco área de contacto célula a célula. En las paredes celulares de plantas se pueden distinguir tres tipos de pectinas: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos de tipo I (RG-I) y ramnogalacturonanos de tipo II (RG-II). En la lámina media de las paredes celulares, los HGA, una cadena principal lineal de 1,4-ligado ácido galacturónico, son predominantes. Las enzimas que degradan ramnogalacturonanos, como RG-hidrolases y RG-liasas, fueron identificadas por primera vez en varios hongos. Estas enzimas digieren la principal cadena RG-1.

En este trabajo, nosotros hemos observado que *FaRGlyase1* podría jugar un papel importante en el proceso de reblandecimiento del fruto asociado a la maduración, que

reduce la firmeza y la vida post-cosecha. La expresión de *FaRGlyase1* tiene lugar principalmente en el receptáculo, en paralelo a la maduración, y se regula positivamente por ABA y negativamente por auxinas.

Por otro lado, la expresión del *FaRGlyase1* fue silenciada de manera transitoria a través de la inyección de *Agrobacterium* portando la construcción RNAi al receptáculo del fruto. Los análisis de microscopía óptica y electrónica de estos frutos silenciados revelaron que este gen está implicado en la degradación de pectinas presentes en la región de la lámina media entre las células parenquimáticas.

Además, análisis de ligamiento genético en una población segregante de fresas han mostrado que *FaRGlyase1* está asociado a un grupo de ligamiento QTL relacionado con la dureza y la firmeza del fruto. Los resultados muestran que *FaRGlyase1* podría jugar un papel importante en el proceso de reblandecimiento del fruto asociado a la maduración, que reduce la firmeza y la vida post-cosecha.

El siguiente gen seleccionado para su estudio fue una acuaporina, *FaNIP1;1*, que se induce fuertemente en frutos maduros, y que codifica una acuaporina tipo *NOD26-like intrinsic protein* (NIP). Las acuaporinas pertenecen a la familia de las proteínas canales integrales de membrana, conocidas como *Major Intrinsic Proteins* (MIPs). Las MIPs son particularmente abundantes en plantas y muestran una gran diversidad y multiplicidad, la cual es debida a la necesidad de un control fino del agua, que permite a las plantas adaptarse al cambio de condiciones ambientales.

En el fruto de fresa, los movimientos de agua son cruciales ya que ellos permiten la rápida expansión del fruto. Ha sido demostrado que el tamaño de la baya correlaciona positivamente con la cantidad de irrigación aplicada durante la floración y el desarrollo del fruto. Los balances hídricos siempre acompañan movimientos de agua a través de membranas biológicas, es decir, difusión a través de canales de agua.

En este trabajo, nosotros reportamos que la proteína *FaNIP1;1* podría jugar un papel importante en el control de la hidratación del fruto de fresa. Los análisis mediante qRT-PCR de *FaNIP1;1* muestran que este gen principalmente se expresa en el receptáculo del fruto y tiene un patrón de expresión relacionado con la maduración, que va

acompañada de un incremento en paralelo del contenido de ácido abscísico y de agua en el fruto a lo largo de maduración. Además, *FaNIP1;1* fue inducido en situaciones de estrés hídrico. Adicionalmente, mostramos que la expresión de *FaNIP1;1* fue regulada positivamente por ABA y negativamente por auxinas.

La capacidad para transportar agua de *FaNIP1;1* fue determinada mediante un experimento llamado espectroscopía *stopped-flow* en levaduras que sobreexpresaban *FaNIP1;1*. También fue demostrado el transporte de glicerol, H₂O₂ y boro en levaduras. Por otro lado, la proteína de fusión GFP-*FaNIP1;1* fue localizada en la membrana plasmática.

En conclusión, *FaNIP1;1* parece jugar un papel importante incrementado la permeabilidad de la membrana, lo que permite la acumulación de agua en el receptáculo del fruto de fresa a lo largo del proceso de maduración.

Los factores de transcripción (FTs) son esenciales para la regulación de la expresión génica en plantas. Sin embargo, es escaso el conocimiento relacionado con el papel regulatorio jugado por diferentes FTs a lo largo del proceso de maduración del fruto de fresa. Por eso, otro de los genes seleccionados fue un factor de transcripción perteneciente a la familia DOF, *FaDOF2*, el cual está implicado en la regulación de la producción de fenilpropanoides volátiles. Los factores de transcripción de tipo DOF (DOF-TFs) constituyen una familia multigénica específica de plantas, que regulan fisiológicamente muchos complejos y específicos procesos y rutas metabólicas en plantas. Presento estudios moleculares y fisiológicos mostrando que *FaDOF2* está implicado en la regulación de la producción endógena de eugenol, un fenilpropanoide volátil en receptáculos de fruto maduro.

La expresión de *FaDOF2* está relacionada con la maduración y es específica del receptáculo del fruto, aunque también se encontró un valor alto en pétalos. Este patrón de expresión correlacionó con el contenido de eugenol, en receptáculo de fruto y en pétalos. La expresión de *FaDOF2* fue reprimida por auxinas e inducida por ABA durante el desarrollo y el proceso de maduración, respectivamente.

Cuando la expresión de *FaDOF2* fue reprimida en receptáculos maduros de fruto, la expresión de *FaEOBII* y *FaEGS2*, dos genes clave implicados en la producción de eugenol, fue también reprimida. Estos frutos mostraron un descenso concomitante en el contenido de eugenol, el cual confirmó que *FaDOF2* es un factor de transcripción implicado en la producción de eugenol en receptáculos de fruto maduro.

Mediante el uso de el sistema de doble híbrido en levaduras, hemos demostrado que *FaDOF2* interacciona con *FaEOBII*, regulador de la producción de eugenol previamente demostrado en otro estudio. Nuestro resultado indica que la interacción mutua entre *FaEOBII* y *FaDOF2* determinaría la regulación precisa de la expresión de genes clave responsables de la producción del eugenol. Adicionalmente se demostró que la expresión de *FaEOBII*, pero no la de *FaDOF2*, está bajo el control de *FaMYB10*, un factor de transcripción R2R3 MYB máster, que regula los genes biosintéticos *tempranos* y *tardíos* en la ruta de los flavonoides/fenilpropanoides.

Estos resultados evidenciaron que *FaDOF2* juega un papel regulador subsidiario con *FaEOBII* de la expresión de aquellos genes estructurales que controlan la producción de eugenol. En conjunto, nuestros resultados aportan nuevo conocimiento sobre la regulación de la ruta de fenilpropanoides en el receptáculo maduro de fresa.

El siguiente gen seleccionado para ser estudiado fue un regulador de la transcripción perteneciente a las proteínas BTB-anquirina de la clase *BLADE-ON-PETIOLE* (BOP), *FaBOP1*. De acuerdo con su secuencia aminoacídica, *FaBOP1* contiene un dominio BTB-POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac/POX virus and Zinc finger) en el extremo N-terminal, así como cuatro motivos anquirina localizados cerca del extremo C-terminal. Estos dos motivos conservados han sido previamente propuestos como motivos de interacción proteína-proteína.

La maduración de fruto de fresa es un proceso complejo, durante el cual se llevan a cabo cambios en aroma, color y testura. La red reguladora que soporta estos cambios moleculares y metabólicos que ocurren durante la maduración han sido escasamente estudiadas.

Análisis transcriptómicos de alto rendimiento nos permitieron identificar este gen inducido durante la maduración, cuya expresión fue casi específica del receptáculo y de hormonalmente regulada, de manera antagonista, por auxinas y ABA. Las proteínas BTB-anquirina son específicas de plantas y co-activadores de la transcripción.

La expresión de *FaBOP1* fue silenciada en receptáculo de fruto maduro. Como efecto fenotípico del silenciamiento, observamos una falta de color, comparado con los receptáculos controles. Los genes de la ruta de flavonoides/fenilpropanoides estaban silenciados en los frutos transgénicos. Esto fue corroborado mediante la comparación de los metabolitos entre frutos controles y transgénicos.

Mediante el sistema de doble híbrido en levaduras, demostramos que FaBOP1 interacciona con FaMYB10, un factor de transcripción R2R3 MYB máster, que regula los genes biosintéticos *tempranos* y *tardíos* en la ruta de los flavonoides/fenilpropanoides.

Nuestro estudio ha revelado el papel del coactivador de tipo BOP, FaBOP1, el cual se une al factor de transcripción R2R3 MYB10 y de este modo, regula la biosíntesis de flavonoides/fenilpropanoides. El dramático efecto en el fenotipo y el perfil metabólico en los frutos transgénicos silenciados claramente muestra la importancia del papel jugado, como co-activador, por FaBOP1 en el receptáculo del fruto de fresa. Así pues, los cambios moleculares y metabólicos más importantes asociados con la maduración fueron afectados por el silenciamiento de *FaBOP1*.

SUMMARY GENERAL INTRODUCTION

SUMMARY GENERAL INTRODUCTION

The strawberry (*Fragaria × ananassa*) belongs to the family Rosaceae in the genus *Fragaria*. This soft fruit is cultivated in different regions of the world and is part of the diet of millions of people. Spain is the first producer of strawberries in Europe and the second one in the world after United States (FAO, 2012). The main octoploid variety *Fragaria × ananassa* cultivated is the result of crossing two native American species, *F. virginiana* and *F. chiloensis* (Hancock, 1999; Mabberley, 2002; Eriksson *et al.*, 2003). The wild diploid species *Fragaria vesca* is also considered as an ancestor of the cultivated octoploid variety. Recently, the genome of the wild species *Fragaria vesca* has been sequenced (Shulaev *et al.*, 2011). This information, together with the ESTs (expressed sequence tag) availability from cultivated species and the development of efficient transformation techniques of these varieties, will allow the development of genomics and recombinant DNA studies between different species of Rosaceae in the future (Bombarely *et al.*, 2010).

The strawberry is an herbaceous perennial plant that has a central stem or crown from which leaves, roots, stolons and inflorescences emerge (Hancock, 1999). The development of the strawberry is determined by the interaction between temperature and photoperiod. The strawberry fruit is considered as a false fruit composed by the achenes (true fruits) and the receptacle, which results of the flower receptacle development (Erendorfer, 1983; Hancock, 1999). The receptacle is formed by a pith at the centre, a fleshy cortex, epidermis, and a ring of vascular bundles with branches that connect the receptacle with the achenes embedded in the epidermal layer. Each fruit can have from 20 to 500 achenes, depending on the cultivar and environmental conditions, formed for a combination of seed and ovary tissue.

Strawberry fruit has been classified as non-climacteric, since there is no concomitant burst of respiration and ethylene production that triggers to the ripening process. Thus, all changes related with the fruit ripening occur without a significant increase in ethylene production, which suggests that this process is independent of this hormone

(Iwata *et al.*, 1969a and 1969b; Villareal *et al.*, 2010). The strawberry fruit has a maximum respiration at the transition between stages ripe to overripe.

Strawberries are much appreciated for their flavor, aroma and nutritional value. The mature fruit is composed of approximately 90 % water and 10% total soluble solids. Moreover, it contains many important dietary components such as vitamin C, soluble sugars such as glucose and fructose (which constitute over 80 % of total sugars), organic acids such as citric acid (88 % of total acids) and ellagic acid, which has anticancer properties (Green, 1971; Wrolstad and Shallenberger, 1981; Maas *et al.*, 1991; Hemphill and Martin, 1992; Maas *et al.* 1996; Hancock, 1999).

Soft fruits have an initial phase of growth and elongation, followed by a phase of maturity. The growth of the strawberry receptacle depends of the cortex and medulla cells development while the fruit size is mainly determined for the medulla cells development and the fruit position in the inflorescence (Hancock, 1999). Moreover, the fruit development is determined by the number and distribution of achenes, the receptacle area around each achene and the percentage of fertilized carpels. In this sense, the synthesis of auxin, fundamentally indole-3-acetic acid (IAA), which takes place in the achenes, is considerate the main responsible of the receptacle growth while gibberellins, cytokinins and abscisic acid have a limited role in the fruit growth (Nitsch,1950; Perkins-Veazie, 1995).

The growth kinetics changes depending on the cultivar. Thus, while some cultivars present a single sigmoidal growth phase, other ones show a two-phase model of growth (Woodward, 1972; Archbold and Dennis, 1984; Forney and Breen, 1985; Stutte and Darnell, 1987; Perkins-Veazie and Huber, 1987). During elongation, cortical cells undergo an isodiametric growth, together with important changes in the cell wall and subcellular structures. The ripening phase is completed in 30-40 days from anthesis and is determined by physical changes (changes of texture and color), chemical changes (production of aromas and flavors) and variation of gene expression patterns (Knee *et al.*, 1977; Dennis, 1984). At cellular level, maturation causes an increase in cell size, the formation of great vacuolar spaces and modifications of the cell wall that cause occlusion of the intercellular spaces with a carbohydrate matrix (Neal, 1965). In any

case, the phase of cell elongation of strawberry fruit depends of the temperature, the contribution of assimilates and water balance fruit / plant.

Along the development and ripening processes, the strawberry fruit suffers important molecular changes such the removal of existing polypeptides and the synthesis of new proteins (Manning, 1994). In this sense, three evolution models of the transcripts have been described: mRNA whose concentration increases along the ripening, mRNA whose levels decrease over the ripening, and mRNA whose components exceed their maximum concentration in the intermediate stage, which then declined in stages of maturation (Veluthambi and Poovaiah, 1984; Reddy and Poovaiah, 1990; Reddy *et al.*, 1990; Manning, 1994).

The hormonal regulation of the fruit development and maturation is one of the most studied processes in strawberry. Auxin produced by the achenes inhibits the fruit ripening in the green stage and, when the IAA concentration declines in the receptacle due to the achenes lignification, the fruit development and ripening begin (Given *et al.*, 1988b). This suggests that the auxin stimulates the elongation of the fruit while repress its maturation. In parallel, a maximum activity of both, cytokinins and gibberellins, has been detected mainly in achenes 7 days after anthesis. It has been suggested that the GAs could control the induction of cell division in subapical tissues of axillary buds while that variations in the concentration of cytokinins are important in the process of flowering of strawberry plants (Eshghi and Tafazoli, 2007; Hytönen *et al.*, 2009). Additionally, GAs also participates in the differentiation of axillary buds regulated by photoperiod (Hytönen *et al.*, 2009). On the other hand, the abscisic acid (ABA) is also very important in the strawberry development. Generally, this phytohormone is involved in seed maturation, acquisition of tolerance to senescence, in vegetative growth, and in the physiological responses that confers tolerance to water and osmotic stress (Mishra *et al.*, 2006). Moreover, the ABA slows down the growth in plants subjected to water stress by the restriction of ethylene production (Sharp, 2002) and acts over the biotic response (Fan *et al.*, 2009). In strawberry fruit, this hormone is accumulated in both achenes and receptacles after 20 days post anthesis. This increase is concomitant with the decrease of IAA level in both tissues, therefore the ratio ABA /IAA might be sufficient to drive genetic changes that occurs during the transition of elongation phase to fruit ripening phase (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). ABA seems to

play a crucial role in the regulation of fruit ripening as the application of exogenous ABA promotes the ripening of strawberry (Jia *et al.*, 2011). The *FaNCED1* gene silencing, which encodes an important protein in ABA biosynthesis, reduced the endogenous ABA levels in the strawberry fruits producing transgenic fruits without colour with the ripening inhibited (Jia *et al.*, 2011). Moreover, the application of exogenous ABA reversed the transgenic phenotype suggesting that ABA promotes maturation of the strawberry fruit (Jia *et al.*, 2011). The ethylene production also has a maximum level in green fruits (G1-G3) that decreases in white fruit (W) and increases again reaching a maximum in the mature stage (R) (Perkins-Veazie, 1995). This amount of ethylene produced during the strawberry ripening, although small, might be sufficient to trigger some of the physiological changes associated with this process (Trainotti *et al.*, 2005).

Carbohydrates are one of the main soluble compounds of the soft fruits. In addition to provide energy for metabolic changes, the carbohydrates have an outstanding role in the generation of flavor. Organic acids, besides being compounds determinants of strawberry fruit flavor, also determine its color, inhibit activity of certain enzymes and change the texture of the fruit (Mussinan and Walradt, 1975). The no-volatile organic acids (citric, malic, etc.) are quantitatively the most important in determining the acidity of the fruit, while volatile organic acids contribute significantly to the aroma of fruit (Mussinan and Walradt, 1975). On the other hand, the phenolic acids provide the fruit acidity and tannins are responsible of the astringency of the fruit as result of its interaction with proteins and mucopolysaccharides of the spit (Ozawa *et al.*, 1987; Ferrer, 1997). The flavones provide the characteristic bitter flavor of the development green stages (Hobson, 1993). These compounds are usually stored in the vacuole and its concentration varies during ripening depending on the variety and the environmental conditions of the plant.

The flavor of strawberry fruit is determined by the complex mixture of volatile compounds and other constituents (such as sugars, organic acids, phenolics and tannins), although esters are one of the most important groups of volatile compounds associated with the aroma of strawberry. Of all these compounds, about one hundred different types have been identified but only some of them contribute decisively to

determine to the final fruit aroma (Zabetakis and Holden, 1997). In ripe strawberry fruit, the most abundant volatile esters are ethyl butanoate, 2-methyl-ethyl butanoate and ethyl hexanoate. One of enzymes involved in the formation of these esters is the alcohol acyl transferase (AAT) that catalyzes the transfer of the acyl group from acyl-CoA to an alcohol. The AAT expression begins in the white stage of fruit and continues increasing in the intermediate stage to its maximum expression in the red stage, coinciding with the highest levels of volatile esters in the fruit (Pérez *et al.*, 1996; Aharoni *et al.*, 2000). On the other hand, terpenoids are other compounds that also seem to be involved in the aroma of strawberry (Loughrin and Kasperbauer, 2002). Linalool, nerolidol, α -pinene and limonene are predominant volatile terpenes in strawberries that can be up to 20 % of total volatile fruit (Loughrin and Kasperbauer, 2002). The recombinant enzyme FaNES1 synthesized (S)-linalool and trans-(S)-nerolidol of GDP and FDP respectively. This gene is expressed strongly and specifically in fruits of cultivated varieties (octoploid) but not in wild varieties. Thus, the linalool and nerolidol are part of the final composition of the fruit aroma in strawberry cultivated varieties. Therefore, the aroma of strawberry is the result of the combination of odors "fruity" (ethyl butanoate, ethyl hexanoate and methyl 2-methylbutanoate), "green" (Z-3-hexenal), "sweet" (acid butanoic acid and 2-methylbutane), "peach" (decalactone), "candy" (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF, furaneol) and 2.5-diethyl-4-methoxy-3 (2H)-furanone (DMMF)) (Aharoni *et al.*, 2004). From these volatile compounds, the HDMF shows a high concentration and a low odor threshold.

Along the development process and strawberry fruit ripening, there is a color transition from the initial green color to red color characteristic of fully mature fruit. This color change is due both to degradation of chlorophyll and the synthesis of anthocyanins located in the vacuoles (Timberlake, 1981; Perkin-Veazie, 1995). Anthocyanin biosynthesis begins in the white fruit from phenylpropanoid and flavonoid by the shikimic acid pathway. The predominant anthocyanin in strawberries is pelargonidin-3-glucoside, which represents 88% of the anthocyanin in the fruit (Perkin-Veazie, 1995). The total concentration of anthocyanins varies about 16 times in the different cultivars and also in its composition. Recently, all these secondary metabolites have gained considerable importance due to its ability to prevent and protect against degenerative and cardiovascular diseases.

The formation of flowers on the strawberry plant is induced at low temperatures and short photoperiods while the floral bud development depends of the temperature and day length. Auxins and cytokinins also play an important role in this process. To improve the strawberry crop, adaptability and disease resistance are studying the effect on the development and fruiting of plants changing their hormonal regulation. These changes can be achieved by introducing genes able to alter the endogenous regulation of plant growth. Other tool used for manipulating endogenous phytohormones is the transformation of strawberry plants with oncogenes from *A. rhizogenes* or *A. tumefaciens* (Zuker *et al.*, 2001; Casanova *et al.*, 2005).

The strawberry plants are exposed to different abiotic agents (water deficit, high temperature, salinity, heavy metals and mechanical damage), in its natural habitat and these stress conditions can reduce crop yields by up to 50 %. Recently, physiological, biochemical and molecular studies have been performed to improve the plant tolerance to these stresses. Genes as *Fcor1*, 2 and 3 showed a differential expression at low temperatures (NDong *et al.*, 1997) that was accompanied by an accumulation of the glycine betaine in different strawberry cultivars (Rajashekar *et al.*, 1999). The synthesis of a specific group of proteins called heat shock proteins (HSP) has also been observed under high temperatures conditions (Medina-Escobar *et al.*, 1998). On the other hand, methionine sulfoxide reductase (PMSR) is a relevant peptide in the protection of cells against oxidative damage caused by salt stress and pathogen infection (López *et al.*, 2006).

The strawberry is also susceptible to many diseases and plagues that cause significant economic losses due to expenditure on plant treatments and reducing production. Therefore, the improvement of the strawberry natural resistance by genetic manipulation is an important research objective. For instance, the loci *Rfp1* is associated with the resistance to *Phytophthora fragaria* (Haymes *et al.*, 1997). Moreover, polygenic factors present additive effects against *Verticillium dahliae* (Zebrowska *et al.*, 2006). The strawberry plants produce volatile organic compounds (VOC), which have antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* (Arroyo *et al.*, 2007). In addition, Fragarina is a small molecule that responses to stress processes (Filippone *et al.*, 1999).

Finally, transgenic strawberry plants with high levels of chitinase reduce the harm effects caused by the oidium fungus (Asao *et al.*, 1997; Asao *et al.*, 2003).

In general, the programs of biotechnology and breeding of berries have as priority the improvement of the fruit quality. For these fruits, the taste (result of the combination of sweetness, acidity and aroma), and firmness are of great economic importance and, therefore, the genes involved in these processes are being studied by transgenesis. However and, although the evaluation of the transgenic gene function can be a valuable tool for the selection of genes, is quite slow.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La planta de fresa: generalidades

1.2. Origen, especiación y evolución

La fresa, es un fruto de tipo baya con gran importancia económica en todo el mundo perteneciente al género *Fragaria* L. Este género está incluido dentro de la familia Rosaceae, subfamilia Potentilloideae (anteriormente clasificados dentro de la subfamilia Rosidaeae), teniendo como parientes cercanos a *Duchesnea* y *Potentilla* (Mabberley, 2002; Eriksson *et al.*, 2003). Las rosáceas es una de las familias con mayor importancia económica en el mundo ya que, además de la fresa, incluye otras especies frutales pertenecientes a diversos géneros como *Prunus*, *Malus* (con más de 2000 variedades registradas), *Pyrus* o *Rubus*, así como especies de uso ornamental como las pertenecientes al género *Rosa* (con más de 5000 cultivares registrados), *Potentilla* o *Sorbus*. El género *Fragaria* incluye 23 especies (Tabla 1) distribuidas en la zona norte templada y zona holártica (Staudt, 1989, 1999a, b; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008). Actualmente, se han caracterizado las especies europeas, americanas (Staudt *et al.*, 1989; 1999a) y asiáticas (Staudt 1999b, 2003, 2005; Staudt y Dickoré., 2001) de *Fragaria* y están bajo estudio las especies chinas, aunque su caracterización requiere la recopilación y el análisis taxonómico mundial (Dai *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2005). En general, la distribución de los niveles de ploidía específicos en determinados continentes refleja la historia y evolución de estas especies (Staudt, 1999).

En el caso de *Fragaria* × *ananassa*, los cultivos actuales de esta especie son el resultado del cruzamiento entre dos especies americanas nativas, *F. chiloensis* y *F. virginiana* Duch. (Hancock, 1999). Estas dos especies fueron introducidas en Europa en el siglo XVIII y, posteriormente, fueron cruzadas entre sí.

La especie diploide *Fragaria vesca* también ha sido considerada como un antepasado de la variedad cultivada octoploide. Recientemente, se ha secuenciado el genoma de esta especie (Shulaev *et al.*, 2011) y la información obtenida, junto con la disponibilidad de ESTs (*expressed sequence tag*) de especies cultivadas y el desarrollo de técnicas de transformación de estas

variedades, permitirán en un futuro el desarrollo de estudios de ADN recombinante y genómica entre diferentes especies de rosáceas (Bombarely *et al.*, 2010).

Tabla 1: Distribución de las especies de fresa en el mundo (*Fragaria* L.)
(Hummer K.E. y Hancock J., 2009).

Especies	Ploidía	Distribución geográfica
<i>F. bucarica</i>	2x	Oeste del Himalaya
<i>F. daltoniana</i> J. Gay		Himalayas
<i>F. gracilis</i> A. Los.		Norte de China
<i>F. innumae</i> Makino		Japón
<i>F. mandshurica</i> Staudt		Norte de China
<i>F. nilgerrensis</i> Schlect.		Sureste de Asia
<i>F. nipponica</i> Lindl.		Japón
<i>F. nubicola</i> Lindl.		Himalaya
<i>F. pentaphylla</i> Lozinsk		Norte de China
<i>F. vesca</i> L.		Europa, Oeste de Asia, Urales, Norte de América
<i>F. viridis</i> Duch.		Europa y Asia
<i>F. yezoensis</i>		Japón
<i>F. corymbosa</i>	4x	Norte de China
<i>F. gracilis</i>		Noroeste de China
<i>F. moupinensis</i> (French.) Card		Norte de China
<i>F. orientalis</i> Losink syn.= <i>F. corymbosa</i> Lozinsk		Región extremo oriental de Rusia/China
<i>F. tibetica</i> spec. Nov. Ataudt		China
<i>F. × bringhurstii</i> Staudt	5x	California
<i>F. moschata</i> Duch.	6x	Euro-Siberia
<i>F. chiloensis</i> (L.) Miller	8x	Oeste de Norte América, Hawaii y Chile
<i>F. virginiana</i> Miller		Norte América
<i>F. × ananassa</i> Duch. Ex Lamarck		Cultivado en todo el mundo
<i>F. iturupensis</i> Staudt	10x	Isla Iturup, islas Kurile

1.2. Citología e interfertilidad

El género *Fragaria* tiene un número cromosómico básico de siete ($x = 7$) (Ichijima, 1926) pero se han identificado cinco grupos principales de fertilidad (Hirakawa *et al.*, 2014): los diploides ($2n = 2x = 14$), que incluyen a *F. vesca* (Oosumi *et al.*, 2006); los tetraploides ($2n = 4x = 28$), dentro del cual está *F. orientalis*; la especie hexaploide *F. moschata* ($2n = 6x = 42$); las especies octoploides ($2n = 8x = 56$), entre ellas *F. chiloensis*, *F. virginiana* y el híbrido cultivado *Fragaria × ananassa*; y una decaploide, *F. iturupensis*. Hasta ahora, tres modelos de distribución genómica llamados AABBBBCC (Federova *et al.*, 1946), AAA'A'BBBB (Senanayake *et al.*, 1967) y AAA'A'BBB'B' (Bringhurst, 1990) han sido propuestos para *Fragaria × ananassa* basándose en datos genéticos y citológicos. De todos ellos, el tercer modelo es considerado el más probable ya que varios estudios han mostrado la herencia disómica de un elevado número de marcadores de ADN, lo que sugiere una composición alopoliploide del genoma de *Fragaria × ananassa* (Hirakawa *et al.*, 2014).

Se han propuesto numerosos progenitores diploides para las especies octoploides, incluyendo *F. vesca* y la especie japonesa endémica *F. iinumae* (Hancock, 1999), pero se están utilizando otras especies diploides para la investigación genómica de *Fragaria*, incluyendo *F. iinumae* (Folta y Davis, 2006), *F. viridis* (Sargent *et al.*, 2003; Nier *et al.*, 2006) y *F. nubicola* (Sargent *et al.*, 2004a; 2006 y 2007; Vilanova *et al.*, 2008). De hecho, se han propuesto a *F. vesca*, *F. nubicola* y *F. orientalis* como posibles progenitores de las especies octoploides en base a un análisis poligénico de las secuencias espaciadoras internas transcritas de los DNA ribosómicos y cloroplásticos llevados a cabo por Potter *et al.* (2000). Por otra parte, Rousseau-Gueutin *et al.*, (2009) propuso que estas especies evolucionaron a partir de cinco subgenomas (X1, X2, Y1, Y2, y Z) clasificados en función de dos genes nucleares, GBSSI-2 y DHAR. Así, ellos propusieron que el genoma de las especies octoploides estaba formado por Y1'Y1'Y1''Y1''ZZZZ o Y1Y1Y1Y1ZZZZ, siendo Y1 el genoma considerado como derivado de las dos especies diploides *F. vesca* o *F. mandshurica*, vía el tetraploide *F. orientalis*, mientras *F. iinumae* fue presumiblemente el progenitor del genoma Z (Hirakawa *et al.*, 2014).

Los cromosomas de *Fragaria* son más bien pequeños, variando entre 0,9 a 1,7 micras de longitud (Yarnell, 1928), y muestran muy poca variación morfológica entre diferentes especies (Iwatsubo y Naruhashi, 1989; 1991). Ichijima (1926) realizó estudios sobre la citología de los cromosomas de *Fragaria* en diversos niveles de ploidía. En las especies diploides estudiadas, no se observó ningún comportamiento cromosómico irregular en el curso de divisiones heterotópicas, conservándose los 14 cromosomas somáticos previamente observados en metafase. En el caso de especies octoploides de *Fragaria*, fue difícil contar los cromosomas somáticos porque su empaquetamiento fue irregular y sólo pudieron ser cuantificados en fase de diacinesis tardía. Así, el número definitivo de cromosomas en estos experimentos no se pudo determinar aunque se estimó que pudieran ser 56, lo que era esperable para una especie octoploide que posee un número haploide de cromosomas $x = 7$. Por otra parte, Lim (2004) empleó en *F. vesca* la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) usando los genes de ARNr 45S y 5S. Los resultados revelaron, dentro de los 14 cromosomas somáticos de *F. vesca*, seis sitios 45S y dos sitios 5S lo que permitió la construcción de un cariotipo de esta variedad que incluía tres pares de cromosomas marcadores. A pesar de los resultados obtenidos con esta técnica, aún no se ha extendido su aplicación para mejorar el conocimiento de la genética y citología de genomas octoploides de la especie *Fragaria* (Hummer K.E. y Hancock J., 2009).

1.3. Análisis filogenético

A partir de ADN procedente del cloroplasto (ADNcp) y secuencias ITS (espaciadores de transcripción interna) de la región nuclear, se han determinado las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de *Fragaria* (Harrison *et al.*, 1997; Potter *et al.*, 2000). Dentro de esta filogenia, se ha encontrado un grupo formado por varias especies monofiléticas (p. ej.: *F. viridis* y *F. nilgerrensis*) y otro mayor formado por *F. vesca*, *F. bucharica* (antes *F. nubicola*) y los poliploides de *Fragaria*.

Sargent (2005) estudió con mayor profundidad las relaciones filogenéticas entre muchos de los diploides de *Fragaria* utilizando datos de secuencias ITS y cuatro regiones ADNcp. De esta manera, se determinó una filogenia que agrupaba los diploides en tres clases: la primera contenía una sola especie, *F. iinumae*; otra que contenía muchas de las especies asiáticas diploides, y una tercera que contenía a *F. vesca*, *F. bucharica* y *F. viridis*. Sin embargo, este estudio no incluyó en su análisis ninguna de las especies poliploides existentes, por lo que no proporcionó pruebas acerca de los orígenes de las especies octoploides de *Fragaria*.

Un estudio realizado sobre la región que contiene el intrón de los genes que codifican una alcohol deshidrogenasa (ADH) (Dimeglio y Davis, datos no publicados), y que abarca la mayoría de los diploides de *Fragaria* y de las especies poliploides, sugiere que los diploides *F. vesca*, *F. bucharica*, *F. mandshurica* y *F. iinumae* son posibles donantes de genoma de las especies octoploides, proporcionando una aclaración sobre el origen de estas especies.

2. Morfología del fruto de fresa

La fresa es una planta perenne de pequeño porte compuesta por diferentes meristemos y cuyo desarrollo viene controlado por la interacción entre la temperatura y el fotoperiodo. Se reproduce de manera sexual y asexual (mediante el desarrollo de estolones). Aunque tradicionalmente ha sido considerada una planta herbácea, no es tal, sino que en realidad se trata de una especie leñosa perenne con iguales o similares pautas fisiológicas que los árboles y arbustos frutales de hoja caduca (López-Aranda, 2008), y con un ciclo de vida corto (de doce a veinte semanas por generación).

La planta de fresa posee un tallo central comprimido en una roseta basal o corona. A partir de ella emergen raíces de tipo fasciculado y hojas trifoliadas dentadas de haz glabrescente y envés con pelos aplicados, cuyos peciolos pueden alcanzar los 20 cm de altura. En la axila de cada hoja, existe una yema o meristemo axilar a partir de la cual pueden desarrollarse estolones o

inflorescencias, dependiendo de las condiciones medioambientales. Los estolones, o tallos rastreros, producen raíces adventicias de las que pueden surgir eventualmente nuevas plantas (reproducción asexual) (Figura1).

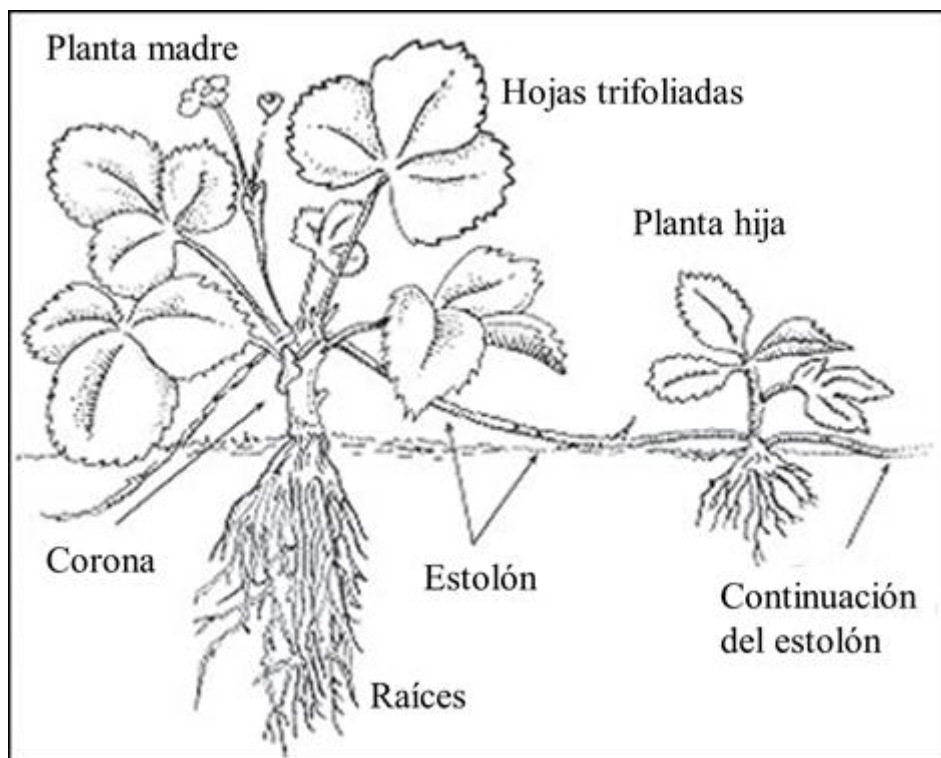


Figura 1: Morfología de la planta de fresa.

En general, la planta de fresa se reproduce sexualmente mediante la formación de pequeñas inflorescencias de pétalos blancos, generalmente hermafroditas, y receptáculo amarillo. En los cultivares de día corto, las inflorescencias se generan cuando los días son cortos y las temperaturas frías, mientras que los estolones se producen en condiciones de día largo y temperaturas templadas. En los cultivares de día neutro, las flores se producen siguiendo un patrón cíclico sin que influya la duración de los días pero a temperaturas relativamente frías (Tabla 2 y Figura2). Por otra parte, las variedades remontantes diferencian yemas de flor más libremente en días largos que en días cortos. Los estolones se producen desde principios de la primavera hasta que se paran por las bajas temperaturas otoñales y, en contraste con las plantas de día corto, producen menos estolones y tienden a formar múltiples coronas. En general, los estolones se producen durante el verano, continúan hasta los primeros días cortos, y no entran en reposo bajo condiciones de día corto si prevalecen las temperaturas favorables.

Aunque los términos día neutro y remontante se suelen usar como sinónimos, las variedades remontantes son producto de una selección natural en zonas continentales y nórdicas mientras que las variedades de día neutro, con comportamiento fisiológico y productivo similar, son

producto de la mejora genética tradicional que busca la ruptura de la dependencia del fotoperiodo para incrementar la producción durante todo el año.

La cantidad de frío que la planta recibe durante la latencia hibernal es muy importante en el comportamiento fenológico de la planta. La fresa necesita satisfacer unas necesidades concretas de horas de frío, entendidas como horas por debajo de los 7 °C, que varían de unas variedades a otras, y que conlleva el paso de la planta por viveros en altura, donde tiene lugar la producción de estolones.

Tabla 2: Número medio de inflorescencias y estolones presentes en plantas de fresa de día corto y neutrosometidas a cuatro temperaturas diferentes a lo largo de tres meses (Durner *et al.*, 1984) (Adaptado de Hancock, 1999).

Temperatura (°C)	<i>Día corto</i>		<i>Día neutro</i>	
	Inflorescencias	Estolones	Inflorescencias	Estolones
18/14	2,1	0,0	3,3	1,7
22/18	0,3	0,0	1,3	2,3
26/22	0,0	0,8	0,0	2,2
30/26	0,0	2,4	0,0	3,3

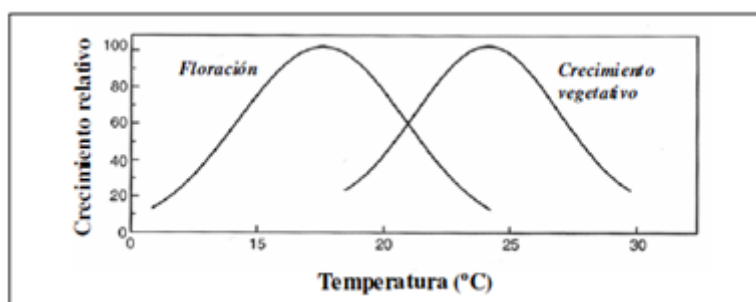


Figura2: Perfil de floración y crecimiento vegetativo de la planta de fresa a diferentes temperaturas.(Adaptado de Hancock, 1999).

Bajo la definición de “frutos blandos” se agrupan varios tipos de bayas. Se trata de frutos pequeños cuyas semillas se encuentran incluidas en un receptáculo. Como ejemplos más representativos de este tipo de frutos, nos encontramos con las grosellas y las fresas.

La fresa se desarrolla a partir de una flor con un gineceo coricárpico (donde cada carpelo representa un carpidio) y en la que el androceo se ha multiplicado de modo secundario por intercalación. A partir de los carpelos se forman frutos monocarpelares indehiscentes (aquenios) que se disponen sobre la superficie del eje floral, el cual adopta un aspecto cónico y una textura carnosa (receptáculo) para dar lugar a un fruto múltiple (Erendorfer, 1983) (Figura3). Por tanto,

la fresa es un fruto que posee una estructura de falso fruto constituido por un receptáculo carnoso en cuyo exterior se encuentran los aquenios (verdaderos frutos).

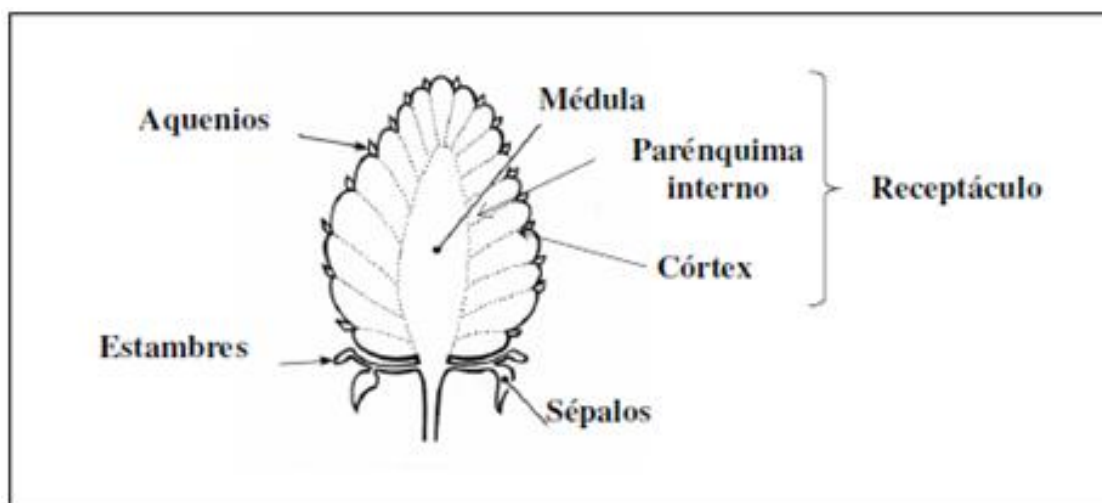


Figura3: Estructura típica del fruto de fresa. (Adaptado de Hancock, 1999).

2.1. Los aquenios

Los aquenios son una combinación de tejido de la semilla y tejido ovárico y se originan en la base de cada pistilo (Darrow, 1966). Se encuentran embebidos en la capa epidérmica del receptáculo y conectados con el interior de éste mediante haces fibrovasculares a través de los cuales obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo y el de las células parenquimáticas del receptáculo circundante. En función del cultivar del que se trate y de las condiciones de crecimiento del mismo, pueden existir entre 20 y 500 aquenios en cada receptáculo (Darrow, 1966). Estructuralmente, los aquenios maduros se caracterizan por presentar un grueso pericarpo, una delgada testa, una única capa endospermática y un embrión que completa su desarrollo diez días después de la antesis (Thompson, 1963).

2.2. El receptáculo

En el receptáculo, el tejido vascular forma un eje central en torno al cual se disponen los tejidos parenquimatoso y epidérmico del córtex (Havis, 1943). Los haces vasculares se extienden desde el pedicelo, atravesando el tejido parenquimatoso y el córtex, hasta alcanzar a los aquenios localizados en la superficie del receptáculo. Su epidermis es ligeramente pubescente y está formada por una o dos capas delgadas de células. El receptáculo presenta estomas protuberantes y abiertos, relacionados con la transpiración y respiración del fruto (Perkins-Veazie, 1995).

3. Composición del fruto de fresa

El fruto de fresa es el tejido sumidero más importante de la planta, acumulando entre el 20-40% del total del peso seco de ésta. La fructificación inhibe la producción de estolones, coronas e inflorescencias, sin embargo, no afecta generalmente a los niveles totales de peso seco en la planta salvo en raíz, donde se produce una reducción de la biomasa durante dicho proceso (Hancock, 1999).

La fresa es muy apreciada por su delicado sabor, aroma y por su valor nutricional. El fruto maduro se compone aproximadamente en un 90% de agua y en un 10% de sólidos solubles que incluye numerosos componentes importantes de la dieta (Hemphill y Martin, 1992). Son ricas en vitamina C (o ácido ascórbico). Una cantidad estándar de fresas (10 frutas) suministra el 95 % de los requerimientos dietéticos diarios recomendados de vitamina C (Maas *et al.* 1996). En la naturaleza, la vitamina C se sintetiza a partir de D-glucosa-6-fosfato (D-Glu-6-P) a través de diferentes vías: en animales, la D-Glu-6-P se sintetiza a través de la ruta del ácido D-glucurónico para formar el precursor gulono-1,4-lactona; en plantas, existe una ruta más compleja que involucra diferentes compuestos del azúcar (fructosa, manosa) hasta llegar a la síntesis de galactono-1,4-lactona (Wheeler *et al.*, 1998). Se ha propuesto una vía alternativa para la síntesis de vitamina C en plantas (Agius *et al.*, 2003). Esta ruta sugiere que la síntesis de la vitamina C se produce a partir de la degradación de componentes pectínicos de la pared celular, principalmente de ácido galacturónico (GalUA). La clonación del gen *GalUA reductasa* de fresa (*FaGalUR*) y la correlación de su expresión con el proceso de maduración, parece indicar una relación entre este proceso y el aumento del contenido de vitamina C en el fruto de fresa (Agius *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado que la expresión ectópica en tomate de *FaGalUR* provocó un aumento moderado del contenido de ácido ascórbico así como un incremento de la capacidad antioxidante total de los frutos (Amaya *et al.*, 2014).

Los principales azúcares solubles de la fresa son la glucosa y fructosa, que constituyen más del 80% de los azúcares totales y el 40% del peso total seco (Wrolstad y Shallenberger, 1981). La glucosa, la fructosa y la sacarosa son los azúcares solubles que están presentes en el fruto de fresa en todas las etapas de maduración. La glucosa y la fructosa se encuentran casi a concentraciones iguales (Maas *et al.*, 1996, Ornelas-Paz *et al.*, 2013), incrementando de forma continua durante el desarrollo de la fruta y pasando de un 5% en frutas verdes pequeñas a un 6,9% en las bayas de color rojo (Kader, 1991). Los niveles de sacarosa son generalmente mucho más bajos y muestran una pequeña acumulación cerca del desarrollo de la fruta (Forney y Breen, 1985). Las invertasas probablemente desempeñan un papel importante en la regulación de la dulzura del fruto mediante el control de sus niveles de sacarosa y hexosas (Ranwala *et al.*, 62

1992; Manning, 1998). Por otro lado, ha sido descrito recientemente el papel regulador en la maduración de fresa desempeñado por la sacarosa (Jia *et al.*, 2013). En este trabajo, se ha demostrado la correlación entre los niveles del contenido de sacarosa en receptáculo con los de ácido abscísico (ABA). La reducción del contenido de sacarosa en fruto se consiguió a través del silenciamiento mediante ARN interferente del receptor de sacarosa FaSUT1, seguida de una disminución de los niveles de ABA que condujo a un retraso en la maduración del fruto de fresa. En cambio, la sobre-expresión de *FaSUT1* dio lugar a un incremento del contenido de sacarosa, seguido de un aumento de ABA, acelerando el proceso de maduración (Jia *et al.*, 2013).

Por otra parte, el ácido orgánico principal del fruto de fresa es el ácido cítrico, que constituye un 88% de los ácidos totales (Green, 1971), seguido del ácido málico y del ácido ascórbico, que incrementan su contenido a lo largo de la maduración (Agius *et al.*, 2003; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). La fresa contiene también importantes niveles de ácido elágico, que posee propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Maas *et al.*, 1991; Basu *et al.*, 2014). No obstante, las concentraciones de todos estos componentes dependen del estado de maduración del fruto (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

Tabla 3: Composición del fruto de fresa (por 100 g de peso fresco)
(Maas *et al.*, 1996; Hollman y Venema, 1993). Extraído de Hancock (1999).

<i>Nutriente</i>	<i>Contenido</i>	<i>Nutriente</i>	<i>Contenido</i>
Agua	92 g	Vitaminas	
Proteínas	0,6 g	Vitamina C	56,7 mg
Ácido elágico	0,09-0,4 mg	Otras	<0,5 mg
Carbohidratos totales	7 g	Lípidos	
Fibra	0,5 g	Saturados	0,02 mg
Minerales (mg)		Monoinsaturados	0,052 mg
Ca	14 mg	Poliinsaturados	0,186 mg
Fe	0,4 mg	Colesterol	0
P	19 mg	Fitoesteroles	12 mg
Mg	10 mg	Aminoácidos	
K	166 mg	Todos (n=18)	522 mg
Na	1 mg		
Zn, Cu, Mn	<0,5 mg		

Recientes investigaciones han proporcionado evidencias sustanciales que clasifican las fresas como un alimento funcional con beneficios para la salud, tanto preventivos como terapéuticos

(Basu *et al.*, 2014). Las fresas son una rica fuente de fitoquímicos (ácido elágico, antocianinas, quercetina y catequina) y vitaminas (ácido ascórbico y ácido fólico), así como de polifenoles y antioxidantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos factores bioactivos pueden ser afectados significativamente por las diferencias entre cultivares, las prácticas agrícolas, al almacenamiento post-cosecha y métodos de procesamiento tales como la congelación y el calor seco. A su vez, estudios de epidemiología nutricional han mostrado una asociación inversa entre el consumo de fresa y la incidencia de la hipertensión o la presencia de proteína C reactiva en suero. Más aún, estudios de alimentación controlados han identificado la capacidad de las fresas para atenuar el estrés postprandial oxidativo inducido por una dieta alta en grasas, la hiperglucemia postprandial o la hiperlipidemia en sujetos con factores de riesgo cardiovascular. Las vías bioquímicas específicas que podrían conferir estos efectos protectores de las fresas cursan a través del incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la reducción de la actividad de NF- κ B y la inflamación posterior o la inhibición de las enzimas digestivas de hidratos de carbono. Estos efectos sobre la salud se pueden atribuir a los efectos sinérgicos de los nutrientes y los fitoquímicos de las fresas. No obstante, son necesarios más estudios para definir la dosis óptima y la duración de la ingesta de fresa apropiadas para modular los niveles de los citados biomarcadores o las vías relacionadas con enfermedades crónicas (Basu *et al.*, 2014).

4. Fisiología del fruto de fresa

A lo largo de su desarrollo, los frutos blandos comparten algunas características que son generales en una amplia diversidad de frutos carnosos. Así, encontramos una fase inicial de crecimiento y elongación, seguida de una fase de maduración caracterizada por determinados cambios físicos (cambios de textura y color), cambios químicos (producción de aromas y sabores) (Gapper *et al.*, 2013) y variación de patrones de expresión génica característicos de cada tipo de fruto.

4.1. Cambios macroscópicos

Dentro de los frutos blandos, el género *Fragaria* quizá sea el más estudiado, en términos de fisiología y bioquímica, debido a su estructura de falso fruto constituido por un receptáculo carnoso en cuyo exterior están anclados los verdaderos frutos mediante conexiones vasculares (aquenios).

4.1.1. Crecimiento

El crecimiento del receptáculo de la fresa depende muy directamente del desarrollo de las células del córtex y de la médula, siendo esta última la principal responsable del tamaño del fruto (Hancock, 1999).

El desarrollo del fruto viene determinado por numerosos factores como son el número y distribución de los achenios en el receptáculo, el área de receptáculo alrededor de cada achenio y el porcentaje de carpelos fertilizados. Estos factores condicionan la síntesis de auxinas que tiene lugar en los achenios (Nitsch, 1950; Dreher and Poovaiah, 1982; Archbold and Dennis, 1984). Las auxinas se translocan por el floema basipétalmente desde los achenios hasta el pedúnculo y son las responsables primarias del crecimiento del receptáculo (Nitsch, 1950). Se ha comprobado que la separación parcial de achenios en frutos verdes de estadio de desarrollo temprano da lugar a un receptáculo maduro expandido sólo en las proximidades de los achenios presentes. Además, la aplicación de auxinas sintéticas de forma exógena restaura el crecimiento del receptáculo en frutos a los que se les habían retirado los achenios (Nitsch, 1950). Debido a esto, gran parte del crecimiento de la fresa ha sido atribuido a la capacidad de las auxinas para estimular el transporte de asimilados. Por ello, las variaciones en el tamaño del fruto entre los distintos cultivares podrían estar determinadas en parte por la actividad promotora del crecimiento que ejerce de manera individualizada cada uno de los achenios. Por otra parte, las giberelinas, citoquininas y ácido abscísico parecen tener también un papel limitado en el crecimiento del fruto (Perkins-Veazie, 1995).

El tamaño del fruto también está influenciado por la posición que éste ocupa en la inflorescencia, de manera que su tamaño es menor según se trate de frutos primarios, secundarios o terciarios (Moore *et al.*, 1970) (Figura4). Este hecho podría estar relacionado con un periodo de retraso tras la polinización, más largo en el caso del crecimiento del fruto secundario y terciario (Moore *et al.*, 1970). La eliminación de los frutos primarios de la planta motiva un incremento del peso de los frutos secundarios, lo cual parece indicar que se produce una competencia entre los frutos semejante a la dominancia apical en el vástago (Stutte y Darnell, 1987). Se sabe que las diferencias en el tamaño final del fruto están determinadas genéticamente y que éstas están relacionadas con el número y tamaño de los achenios viables desarrollados en el mismo (Moore *et al.*, 1970).

El fruto de fresa crece rápidamente y, dependiendo de las condiciones medioambientales, alcanza su tamaño total y definitivo aproximadamente 30 días después de la antesis. La cinética de su crecimiento parece variar con el cultivar, presentando algunos de ellos una única fase de crecimiento sigmoideal (Woodward, 1972; Forney y Breen, 1985; Stutte y Darnell, 1987), mientras que otros presentan modelos bifásicos de crecimiento (Archbold y Dennis, 1984;

Perkins-Veazie y Huber, 1987). Se ha sugerido que el crecimiento bimodal del receptáculo está relacionado con el desarrollo del endospermo y del embrión dentro de los aquenios (Perkins-Veazie y Huber, 1987), de manera que el segundo periodo de crecimiento acelerado coincide con la maduración del embrión en los aquenios, fenómeno que acompaña a la maduración del receptáculo. Hasta el décimo día tras la polinización, se puede observar un crecimiento logarítmico del peso fresco del receptáculo debido a un aumento de la división y alargamiento celular. A partir del día 20 después de la polinización, aparece una segunda fase de incremento rápido del peso fresco. Posteriormente, a los 25 días, comienza a observarse cambio de color, quedando completada la maduración a los 30 días tras la polinización. Se ha descrito que hay un incremento en la división celular de hasta tres veces durante los primeros 7 días después de la polinización, mientras que todo el crecimiento posterior es debido a la expansión celular (Knee *et al.*, 1977) (Figura5).

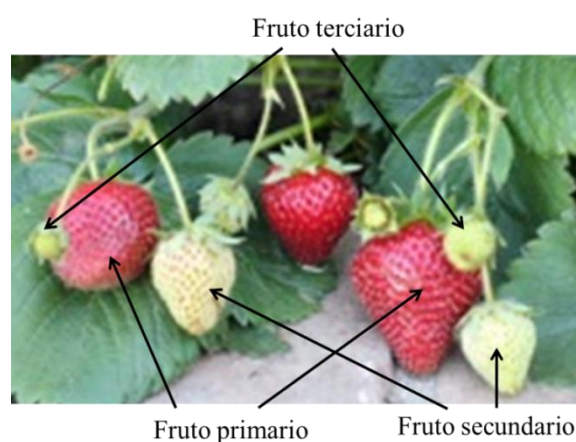


Figura4: Identificación de los frutos primarios, secundarios y terciarios en una planta de fresa.

4.1.2. Elongación

En la fase de elongación celular del fruto de fresa, se produce un crecimiento isodiamétrico de las células corticales acompañado de importantes cambios en la pared celular y en la estructura subcelular (Cheng y Breen, 1992). Esta etapa podría estar condicionada por los efectos directos de la temperatura, del aporte de asimilados (tanto para el crecimiento como para el almacenamiento), y del balance hídrico fruto/planta. Existe una correlación lineal directa entre el aporte hídrico y el crecimiento del fruto, ya que el estrés hídrico causado por déficit de agua o por incremento de irradiancia influye en la disminución de la tasa de crecimiento (Pearce *et al.*, 1993). Sin embargo, a corto plazo, los efectos de estos factores abióticos pueden ser diferentes. La temperatura acelera la velocidad de división y elongación celular así como el proceso de maduración del fruto. Lo mismo ocurre con la irradiancia, que regula la tasa de fotosíntesis

foliar y por tanto el aporte de carbono al fruto. Del mismo modo, la transpiración actúa condicionando la elongación celular (Cockshull *et al.*, 1992).

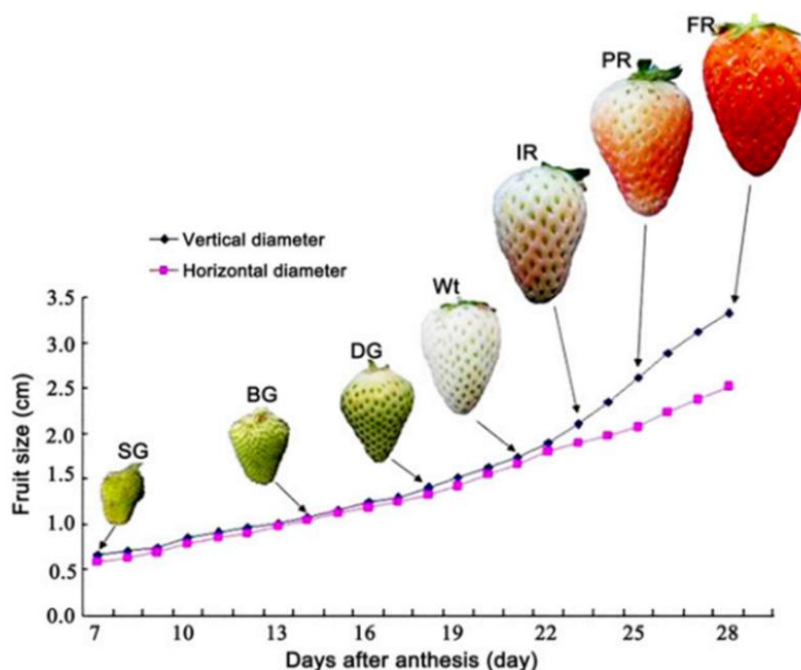


Figura5: Crecimiento del receptáculo del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración.
(Extraído de Jia *et al.*, 2011)

4.1.3. Maduración

En la mayoría de los frutos blandos, la maduración es un proceso fisiológico de corta duración que sucede rápidamente y en la que los frutos desarrollan una serie de propiedades organolépticas que los hacen aptos para el consumo. En el caso del fruto de fresa, la maduración se completa en 30-40 días desde la antesis (Dennis, 1984) e invariablemente viene determinada por cambios simultáneos en el color, sabor y textura del mismo. A nivel celular, la maduración produce un aumento del tamaño de la célula, la formación de grandes espacios vacuolares, y una modificación de la pared celular que provoca la oclusión del espacio intercelular con una matriz glucídica (Neal, 1965). En cualquier caso, para que el proceso de maduración transcurra adecuadamente, el fruto debe estar unido a la planta ya que, si es separado de ella, sus propiedades organolépticas se reducen de forma significativa.

La firmeza de la fruta es una de las propiedades más importantes a la hora de determinar el grado de madurez y la calidad del fruto y ésta viene determinada por la turgencia celular y por las características y composición de la pared celular. De hecho, el reblandecimiento del fruto comienza con la modificación de la pared celular primaria debida a la solubilización y despolimerización de los polisacáridos que forman parte de ella. Rosli *et al.* (2004) estudió la

composición y estructura de los polisacáridos de la pared celular del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración en tres cultivares con diferente firmeza (“Camarosa”, la más firme; “Toyonaka”, de firmeza media; y “Pájaro”, la más blanda), y comprobó que las principales diferencias entre ellas radicaba en el contenido de polisacáridos de la pared. En general, se observó que la cantidad de hemicelulosa y celulosa disminuyó durante la maduración del fruto en los tres cultivares evaluados, pero no hubo diferencias en su contenido en etapas maduras. Esto sugiere que este polisacárido no tiene un papel fundamental en el reblandecimiento del fruto de fresa (Rosli *et al.*, 2004; Palomer *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 2014).

Las pectinas representan hasta el 60% de la masa de la pared celular en muchos frutos y son el componente más abundante de la lámina media. Estos polisacáridos desempeñan un papel importante en la consistencia de la fruta y en sus cambios de textura durante la maduración. La degradación de pectinas parece ser el principal mecanismo responsable del reblandecimiento de los tejidos de la fresa (Rosli *et al.*, 2004).

Las expansinas están íntimamente implicadas en el proceso de reblandecimiento de la fresa. Su actividad se ha detectado a lo largo de la maduración del fruto, identificándose siete genes diferentes que codifican expansinas (*FaExp 1-7*) (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Un estudio sobre su expresión en varias variedades con diferente firmeza, mostró una correlación directa entre la firmeza del fruto y los niveles de expresión en tres de los siete genes *FaExp* de fresa identificados. Además, los niveles de expresión de las expansinas estudiadas fueron mayores en los frutos procedentes de la variedad más blanda (“Toyonaka”) que en las variedades más duras (“Camarosa” y “Selva”) (Dotto *et al.*, 2006), lo que indica una correlación clara entre la expresión de estos genes y el proceso de maduración. Por otra parte, también se ha detectado un incremento de expresión de las expansinas justo al principio del comienzo de la maduración en el cultivar más blando, lo que apoya directamente la intervención de estas enzimas en el proceso de maduración de la fresa (Dotto *et al.*, 2006). Salentijn *et al.* (2003) analizaron la existencia de diferencias transcriptómicas relacionadas con la firmeza del fruto en diferentes variedades empleando la tecnología de microarrays de ADN. A partir de los datos obtenidos, seleccionaron varios genes candidatos que mostraron expresión diferencial en las variedades estudiadas. Todos los genes seleccionados estuvieron relacionados con la degradación de la pared celular, lo que indica que este proceso es clave en la maduración del fruto. También, observaron un incremento de expresión del gen *FaExp2* (expansina-2) y *FaPG* (poligalacturonasa), ambos implicados en el reblandecimiento del fruto a través de la degradación de la pared celular, y de *Faccr* (cinamoil CoA-reductasa) y *Facad* (cinamil alcohol deshidrogenasa), que codifican enzimas que

participan en la biosíntesis de la lignina. Así, dos clones diferentes de *Faccr* incrementaron su expresión más de 20 veces en frutos blandos (variedad “Gorella”), mientras que los niveles de expresión del gen *Facad* fueron tan sólo 2 ó 3 veces más elevados en variedades firmes (variedad “Holiday”). CCR y CAD catalizan etapas sucesivas en la ruta de biosíntesis de la lignina y sus diferencias de expresión podrían dar lugar a diferencias en la composición de lignina en ambos cultivares. Dado que la lignina es un componente básico del tejido vascular (Aharoni *et al.*, 2002b) y que éste se asocia con la textura del fruto (Jewell *et al.*, 1973), diferencias en el contenido y la composición de la lignina pueden ser importantes para determinar el grado de firmeza del fruto. Por lo tanto, se considera que los genes *Facad* y *Faccr* participan en el control de la firmeza del fruto de fresa (Aharoni *et al.*, 2002b). Recientemente, ha sido caracterizada una peroxidasa, FaPOD27, como una enzima clave en la biosíntesis de lignina y que podría usarse como herramienta biotecnológica en la mejora de la firmeza de las fresas (Yeh *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha estudiado la capacidad de CBMFaEXP2 (Carbohydrate Binding Module Expansin 2) para modificar la pared celular de *A. thaliana* (Nardi *et al.*, 2015). CBMs son dominios auxiliares con capacidad de plegamiento autónomo y de reconocimiento y unión específica a carbohidratos (Boraston *et al.*, 2004). Se ha descrito que CBMFaEXP2 presenta *in vitro* capacidad de unión a diferentes sustratos (celulosa microcristalina, xilanos y pectinas) e interfiere en la actividad de diversas enzimas modificadoras de la pared celular (PGs, pectinasas y EGasas) a través de dichas uniones (Nardi *et al.*, 2013). Plantas transgénicas de *A. thaliana* sobre-expresando *CBMFaEXP2* eran más altas, presentaban una pared celular más gruesa y un contenido mayor de pectinas que las plantas control. Adicionalmente, estas plantas presentaban menor actividad en un grupo de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular (PG, β -Gal y β -Xyl) así como una reducción en los niveles de expresión de los genes que codifican para tales enzimas (*AtPG*, *At β -Gal* y *At β -Xyl*) y de dos expansinas (*AtEXP5* y *AtEXP8*). Paralelamente, estas plantas transgénicas presentaron mayor resistencia frente *Botrytis cinerea*, posiblemente como consecuencia de una mayor integridad de su pared celular (Nardi *et al.*, 2015).

Por otra parte, el fruto de fresa genera cantidades muy pequeñas de etileno debido a la baja concentración de ACC sintasa que presenta (Perkins-Veazie *et al.*, 1995; Perkins-Veazie *et al.*, 1996). Además, se ha observado que la aplicación exógena de etileno no acelera la maduración del fruto ni induce la producción autocatalítica de esta hormona, salvo aplicada a grandes dosis, ya que en tal caso es capaz de incrementar ligeramente la tasa respiratoria del fruto (Janes *et al.*, 1978; Sas *et al.*, 1992; Villareal *et al.*, 2009). Aunque la aplicación de etileno sobre frutos de fresa no tiene un efecto obvio en la maduración, si tiene efecto sobre la expresión de un

conjunto de genes relacionados con dicho proceso (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009). El etileno provoca la represión de la expresión de los genes β -galactosidasa, pectin metilesterasa y β -xilosidasa, implicados en el reblandecimiento del fruto (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009). No obstante, no afecta a la expresión de otros genes relacionados con pared celular, como la expansina *FaEXP2* (Civello *et al.*, 1999). El bloqueo de la acción del etileno con 1-metilciclopropeno (1-MCP) conlleva la represión de la expresión del gen que codifica para la poligalacturonasa (Villareal *et al.*, 2010). Además de los efectos sobre la expresión génica, los tratamientos con etileno provocan un descenso de la actividad enzimática de la endo-1,4- β -glucanasa y la β -xilosidasa (Villareal *et al.*, 2010). Estos resultados indican que, aunque no se trate de una acción relevante como en frutos climatéricos, el etileno puede jugar un papel importante en la maduración del fruto de fresa.

Se ha propuesto recientemente que el tratamiento exógeno con jasmonato de metilo (MeJA) altera los patrones de expresión de determinados genes modificadores de la pared celular, como EG1 (endo-1,4- β -glucanasa 1) y XTH1 (xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa 1), induciendo su expresión, y que estos cambios se encuentran correlacionados con una reducción transitoria de la firmeza de los frutos tratados (Concha *et al.*, 2013). El análisis de las regiones promotoras de estos genes reveló la presencia de elementos de respuesta a MeJA (TGACG y CGTCA) (Concha *et al.*, 2013; Opazo *et al.*, 2013). Por el contrario, los niveles de transcrito detectado correspondiente a genes relacionados con la ruta de biosíntesis de ligninas, CAD (cinamil-alcohol deshidrogenasa) y POD27 (peroxidasa), incrementaron al aplicar MeJA (Concha *et al.*, 2013).

4.2. Cambios microscópicos

Durante el desarrollo del fruto de fresa y tras la caída de los pétalos, se produce un crecimiento inicial del receptáculo que se debe a una combinación de división y expansión celular (Knee *et al.*, 1977). La extensión celular aparece acompañada de importantes cambios en la pared celular y en las estructuras subcelulares. Así, en el momento de la caída de los pétalos, las células del receptáculo poseen paredes celulares densas y vacuolas pequeñas, los plastos contienen granos de almidón, y tanto el complejo de Golgi como los ribosomas son abundantes. Por el contrario, durante el desarrollo, las paredes celulares se engrosan, existe una mayor difusión a través de ellas, y el almidón cloroplastidial es hidrolizado completamente, probablemente para ser utilizado como sustrato metabólico durante las fases de proliferación y elongación celular (Knee *et al.*, 1977). Seguidamente, durante la etapa de maduración, los plastos llegan a degenerar, lo que podría considerarse una característica propia de la senescencia; sin embargo, los

cloroplastos no se transforman en cromoplastos (Knee *et al.*, 1977) y las mitocondrias permanecen perfectamente normales en los frutos maduros. El proceso de maduración también se caracteriza por la creciente hidratación y desorganización de la pared celular, así como por la mayor solubilidad de la lamela media y de la matriz de la pared celular, lo que provoca el reblandecimiento del fruto (Knee *et al.*, 1977).

En la fresa, la lámina media de las células del parénquima cortical es ampliamente degradada a lo largo del proceso de maduración (Perkins-Veazie, 1995; Paniagua *et al.*, 2014), provocando un considerable incremento del espacio intercelular y una importante reducción del área de contacto entre células (Redgwell *et al.*, 1997; Harker *et al.*, 2000). A nivel molecular, los cambios más grandes en la pared celular se producen en la fracción de pectina soluble, que aumenta de un 30% a un 65% en el fruto maduro (Huber, 1984).

Se pueden distinguir tres tipos de pectina en las paredes celulares de las plantas: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RG-I), y ramnogalacturonanos II (RG-II) (Figura6). En la lámina media de la pared celular, los HGA, una cadena principal lineal de 1,4-ligado ácido galacturónico, son predominantes (Vincken *et al.*, 2003). Los HGA contienen grupos heteropoliméricos de cuatro cadenas laterales de una longitud constante. Estas cadenas laterales y los residuos a los que están conectados se conocen como RG-II (Vincken *et al.*, 2003). Los RG-I están compuestos de una columna vertebral que alterna residuos de ácido galacturónico y ramnosa con un 20-80% de residuos de ramnosa sustituidos por cadenas laterales de azúcares neutros. Las pectinas se representan típicamente como una cadena extendida de RG-I (regiones peludas) y los residuos de ramnosa aislados interespaciando las regiones de HGA lisas (Mercado *et al.*, 2011). Sin embargo, Vincken *et al.* (2003) propusieron un modelo alternativo en el que las regiones HGA son cadenas de RG-I laterales. En este modelo, los RG-I jugarían un importante papel estructural en la pared celular y su hidrólisis enzimática podría tener efectos dramáticos en la cohesión de la red de pectina.

4.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor

El sabor del fruto de fresa tiene su origen en la interacción de una mezcla compleja de compuestos volátiles y otros constituyentes mayoritarios del fruto, especialmente azúcares reductores y no reductores, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y taninos.

Carbohidratos

Los carbohidratos son uno de los principales compuestos solubles de los frutos blandos. Además de suministrar la energía necesaria para los cambios metabólicos, tienen un papel determinante en la generación del sabor.

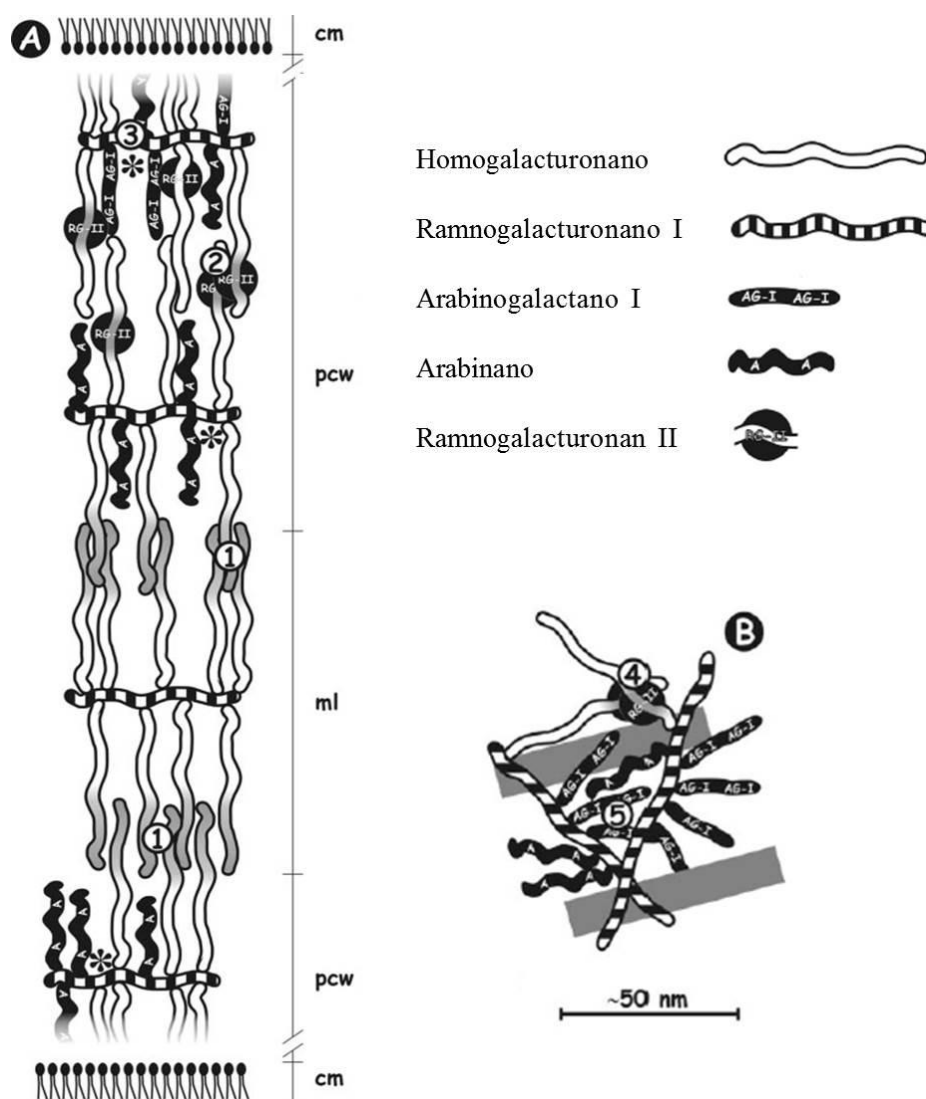


Figura6: Modelo propuesto para la estructura de la red de pectinas presente en la lámina media y pared celular primaria del fruto de fresa (Vincken *et al.*, 2003). A.- Vista lateral de dos paredes celulares primarias separadas por una lámina media que conecta dos células vecinas. 1) La lámina media está formada por moléculas de pectinas. 2) RG-II I intercalados entre las sucesivas capas de pectinas por ésteres de boro-diol. 3) Columna de RG-I presionada contra microfibrillas de celulosa. Ramas de la misma molécula de RG-I alrededor de ambos lados de la microfibrilla. B.- Vista superior de la pared desde la membrana celular a la lámina media. 4) RG-II se intercala entre dos capas de pectinas y entre las moléculas de pectinas de la misma capa. 5) AG-I y arabinanos ocupan los huecos en la pared y podrían tener un papel importante en el control de la porosidad de la pared. Las hemicelulosas no se muestran en esta ilustración esquemática. Las regiones sin metil-estirificación en cadenas de HG están indicadas con sombreado. Barras grises: microfibrillas de celulosa (vista superior); *: microfibrillas de celulosa (sección transversal); cm: membrana celular; PCW: células primarias pared; ml: lamela media.

A partir del sexto día después de la polinización, los asimilados fotosintéticos comienzan a almacenarse en el receptáculo (Manning, 1993; Darnell y Martin, 1988). El principal producto asimilado que se exporta al receptáculo es la sacarosa, empleándose como sustrato metabólico y/o para la generación de otros glúcidos de almacenamiento (Lis y Antoszewski, 1979). La entrada de sacarosa al fruto se produce a través del apoplasto (Ofosu-Anim y Yamaki, 1994) a través de los transportadores de sacarosa FaSUT1-7 (Jia *et al.*, 2013), y la mayoría es hidrolizada en fructosa y glucosa antes de su asimilación por acción de la invertasa (β -fructofuranosidasa) (Forney y Breen, 1986). Durante los primeros 10 días después de la antesis, la sacarosa se encuentra presente en el fruto a concentraciones muy bajas, aumentando rápidamente hasta alcanzar un máximo en el estadio intermedio de maduración y disminuyendo bruscamente de nuevo en frutos rojos (Forney y Breen, 1986). Tras la hidrólisis de la sacarosa, la glucosa y fructosa resultantes constituyen los azúcares más abundantes en el fruto de fresa (Forney y Breen, 1986). Así, en frutos maduros de fresa, la glucosa y fructosa aparecen en concentraciones equivalentes (2.300 y 2.000 mg/100g de peso fresco, respectivamente), constituyendo cerca del 83% de los azúcares totales (Wrolstad y Shallenberger, 1981; Ornela-Paz *et al.*, 2013). No obstante, con el comienzo de la maduración, la sacarosa también empieza a almacenarse como azúcar de reserva (Forney y Breen, 1986). En el fruto de fresa maduro, se han detectado también sorbitol, xilitol y xilosa en cantidades trazas (Makinen y Söderling, 1980). En general, durante el proceso de maduración del fruto se produce la acumulación de azúcares en el apoplasto de las células (Ofosu-Anim y Yamaki, 1994) y dicha acumulación, concretamente la de sacarosa, dispara el proceso de maduración, mediado hormonalmente por un incremento de contenido de ABA y desencadenando la expresión de genes relacionados con la maduración del fruto de fresa (Jia *et al.*, 2013).

Con respecto a la regulación de la captación de azúcares, tanto el ácido abscísico (ABA) como el indolacético (IAA) estimulan la incorporación de azúcares en los frutos de fresa (Ofosu-Anim *et al.*, 1996). El ABA promueve el incremento de los procesos de difusión, mientras que el IAA produce la incorporación de azúcares tanto por mecanismos de transporte activo como por procesos de difusión (Ofosu-Anim *et al.*, 1996). Estos datos subrayan la importancia del ABA y del IAA en la estimulación del proceso de captación de azúcares a lo largo del proceso de maduración del fruto de fresa.

El almidón, principal hidrato de carbono de reserva en plantas, se sintetiza a partir de glucosa en una reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). Park y Kim (2007) aislaron las secuencias de las subunidades mayores (*FagpL1* y *FagpL2*) y pequeña (*FagpS*) de la AGPasa. Comprobaron que la expresión de *FagpL1* y *FagpS* fue elevada y constante durante todo el desarrollo del fruto, mientras que *FagpL2* se expresa débilmente sólo en hojas, lo que

sugiere un control de la expresión de los genes de la AGPasa tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Con el fin de modificar el azúcar contenido en la fresa, Park *et al.* (2006) silenciaron mediante antisentido la expresión de *FagpS* y consiguieron disminuir el contenido de almidón y aumentar el contenido de sólidos solubles en las plantas transgénicas generadas. En otro trabajo reciente, se ha analizado la actividad de cinco enzimas claves (la invertasa ácida soluble (IASI), la sacarosa sintasa (SS), la sacarosa fosfato sintasa (SPS), la hexoquinasa (HK) y la fructoquinasa (FK) en la biosíntesis de azúcar durante la maduración de frutas, destacando diferentes patrones en la actividad enzimática y en la acumulación de azúcar (Xie *et al.*, 2007). Por otra parte, Duangrisai *et al.* (2007) llevaron a cabo la clonación y el análisis de la expresión de los genes sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente (*FaSDH*) y sorbitol deshidrogenasa-6-fosfato (*FaS6PDH*) implicados en el metabolismo del sorbitol en fresa. Los niveles de transcripción de ambos genes fueron cuantificados en fruto y hojas, detectándose sólo actividad enzimática correspondiente a la enzima FaSDH en ambos tejidos.

Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos determinantes del sabor del fruto de fresa, de tal modo que la relación azúcares/ácidos es un factor utilizado como índice de aceptación del fruto por el consumidor. Además de determinar el pH tisular del fruto, los ácidos orgánicos condicionan la estabilidad de su color, inhiben la actividad de ciertas enzimas y modifican la textura del fruto, ya que afectan a las propiedades gelificantes de las pectinas. La mayoría están relacionados con el ciclo de los ácidos tricarbónicos (cítrico, málico) y se acumulan en las vacuolas.

Los ácidos orgánicos no-volátiles (cítrico, málico, ascórbico, etc.) son cuantitativamente los más importantes en la determinación de la acidez del fruto, mientras que los ácidos orgánicos volátiles pueden contribuir de forma más importante en el aroma del fruto (p.e. 2-metilolacetato) (Mussinan y Walradt, 1975). La acidez total del fruto, expresada en base al peso fresco, experimenta un modesto incremento a lo largo del desarrollo del fruto, con un máximo detectado en frutos verdes maduros, seguido por un rápido descenso durante la maduración (Spayd y Morris, 1981). Se ha demostrado que la pérdida de acidez total en el fruto muy maduro se debe, principalmente, a un descenso en el contenido total de ácido málico (Reyes *et al.*, 1982). Estudios más recientes han determinado el contenido de ácido cítrico, málico y ascórbico por separado y a lo largo de los distintos estadios de maduración del receptáculo de fruto de fresa en diversos cultivares (Kafkas *et al.*, 2007; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). En líneas generales, el contenido de ácido cítrico presenta un patrón descendente mientras que el contenido de ácido málico no presenta una correlación clara con el proceso de maduración. Sin embargo, el contenido de ácido ascórbico aumenta a lo largo de la maduración,

considerando a la fresa como un fruto rico en vitamina C. Este hecho le otorga a la fresa un gran potencial sobre los efectos beneficios en la nutrición y salud humana (Ornelas-Paz *et al.*, 2013). No obstante, esta capacidad antioxidante es muy dependiente del cultivar y del tiempo de recogida del fruto (Pincemail *et al.*, 2012).

De los muchos factores que pueden afectar la calidad de la fruta (sensorial y nutricional), el cultivar es especialmente importante, pero también se ve afectada por las condiciones de cultivo. Las principales características relacionadas con la calidad de la fruta y los atributos nutricionales fueron evaluados en diversas variedades de fresas cultivadas en cultivo sin suelo y con suelo (Akhatou and Fernández Recamales, 2014). Se observaron diferencias entre los cultivares basado en la composición mineral y la concentración de glucosa y fructosa entre ambos sistemas de cultivo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre cultivares en acidez. “Tamar” y “Camarosa” fueron los cultivares más dulces entre los que crecen en cultivo sin suelo y con suelo, respectivamente. Ambas variedades también presentaron el ratio azúcares totales / ácidos totales más elevado (Akhatou and Fernández Recamales, 2014).

Compuestos fenólicos

Los fenoles engloban a un grupo muy diverso de sustancias entre los que se encuentran metabolitos secundarios tales como los polifenoles, las proantocianidinas (taninos condensados) y los ésteres de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. En frutos de fresa inmaduros, los compuestos fenólicos están presentes a altos niveles, produciéndose un descenso en su concentración a lo largo del proceso de maduración (Spayd y Morris, 1981). Este comportamiento está muy conservado entre los distintos cultivares analizados (Selva, Sweet Charlie, Oso Grande, Albión...) en la bibliografía publicada más recientemente (Nunes *et al.*, 2006; Ferreyra *et al.*, 2007; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). Entre los ácidos fenólicos, el ácido cafeico es el de mayor abundancia en todas las variedades de fresa analizadas en el trabajo de Voća (2014).

Los ácidos fenólicos proporcionan acidez al fruto y derivan de la fenilalanina por la vía de los ácidos cumárico y cinámico. Los taninos son los responsables de la astringencia del fruto como consecuencia de su interacción con las proteínas y mucopolisacáridos de la saliva (Ozawa *et al.*, 1987; Ferrer, 1997), y las flavonas dan lugar al amargor característico de los estadios verdes de desarrollo. En general, todos estos compuestos están almacenados en las vacuolas y su concentración varía durante la maduración dependiendo de la variedad y condiciones ambientales de la planta (Hobson, 1993). De hecho, se ha propuesto que la pérdida de astringencia que se produce durante la maduración puede deberse a la interacción de las pectinas

solubilizadas con los polifenoles, lo que evitaría que éstos se unieran a las proteínas salivares (Ozawa *et al.*, 1987).

Según lo descrito en la bibliografía, la fresa presenta un perfil sencillo de antocianinas, con la pelargonidina 3-glucósido (PG) como pigmento predominante, seguido de la cianidina 3-glucósido (CG) (Lopes da Silva *et al.*, 2002; Crecente-Campo *et al.*, 2012; Voća *et al.*, 2014). La pelargonidina 3-glucósido (PG), el compuesto antocianina principal encontrado en fresa, es el responsable del color rojo brillante característico del fruto (Crecente-Campo *et al.*, 2012). De hecho, su contenido se correlaciona positivamente con la coloración final del fruto (Ornelas-Paz *et al.*, 2013; Voća *et al.*, 2014). No obstante, el color aportado por las antocianinas depende en gran medida del patrón de hidroxilación del anillo B (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

Por otro lado, cabe destacar el comportamiento del contenido de flavonoles totales, que desciende hasta un 73.7% a lo largo del proceso de maduración. El mismo comportamiento presentan los flavonoles analizados individualmente, entre los que cabe resaltar los derivados del kaempferol como los flavonoles más abundantes (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

Compuestos volátiles

La intensidad del sabor del fruto de fresa depende en gran medida de la percepción olfatoria retronasal del consumidor de los compuestos volátiles, cuyo espectro puede contribuir sobre la intensidad en la percepción sensorial de la acidez y dulzura del fruto. La mezcla de compuestos volátiles en el fruto de fresa es compleja (Tressl *et al.*, 1969), aunque los ésteres son uno de los grupos de compuestos volátiles más importantes relacionados con el aroma de la fresa, los terpenos, los furanos y las cetonas también están ampliamente representados (Schwieterman *et al.*, 2014). De éstos, más de cien tipos diferentes han sido identificados (Zabetakis y Holden, 1997). A pesar de ello, sólo algunos de estos compuestos contribuyen de forma determinante al aroma del fruto (Tabla 4). Además, el perfil de compuestos volátiles contenidos en un fruto de fresa maduro varía en función de la variedad analizada (Schwieterman *et al.*, 2014).

El aroma del fruto de fresa es extremadamente conocido, no sólo como una característica del fruto fresco, sino que también es utilizado como aditivo de otros productos (Hancock, 1999). La abundancia relativa de cada uno de los componentes volátiles es una “huella dactilar” de cada cultivar y especie, lo que ha sido motivo de numerosas investigaciones (Douillard y Guichard, 1990; Larsen y Poll, 1992; Larsen *et al.*, 1992). Las especies silvestres *F. vesca* y *F. virginiana* tienen un aroma mucho más fuerte que las variedades cultivadas (Hirvi y Honkanen, 1982). *F. vesca* contiene grandes cantidades de acetato de etilo, pero pequeñas cantidades de metil-

butirato, etil-butilato y furanona. *Fragaria nilgerrensis* contiene altos niveles de etil-acetato y furanona, pero niveles bajos de metil-butilato y etil-butilato. Los híbridos entre *F. vesca* y *F. × ananassa* tienen niveles intermedios de fragancia y aroma, mientras que los cruces entre *F. nilgerrensis* y *F. × ananassa* se parecen más a los de *F. nilgerrensis*. Aunque cada uno de estos compuestos difiere en sus propiedades organolépticas, probablemente sólo un pequeño número de ellos contribuyen de manera significativa en el aroma. De hecho, la aplicación del concepto de “valor aromático” u olor umbral, que refleja la concentración necesaria para producir olor, indica que únicamente 15 de estos compuestos participan significativamente en el olor característico de la fresa (Shieberle y Hofmann, 1997). Varios estudios en fresa silvestre han identificado que algunos de los componentes clave del aroma de fresa, incluyendo acetatos de alcoholes de hidroxicinamilo y fenilpropanos, como el eugenol e isoeugenol, son derivados de fenilpropanoides (Pyssalo *et al.*, 1979; Ulrich *et al.*, 1995, 2007). La producción de eugenol en frutos de fresa maduros ha sido descrita y cuantificada como superior en fresas de la especie diploide silvestre *Fragaria vesca* frente a las especies domesticadas de *Fragaria × ananassa* (Pyssalo *et al.*, 1979; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). Por el contrario, la biosíntesis de isoeugenol es extremadamente baja en comparación con los niveles de eugenol (Hoffmann *et al.*, 2011). Recientemente, se han descrito dos enzimas eugenol sintetas (FaEGS1 y FaEGS2) que pueden usar como sustrato en una reacción *in vitro* coniferil acetato para dar lugar a eugenol, cuyos genes presentan un patrón de expresión íntimamente correlacionado con el contenido de eugenol tanto en aquenios (FaEGS1) como en receptáculo (FaEGS2) (Aragüez *et al.*, 2013).

En frutos de fresa maduros, los ésteres volátiles más abundantes son el butanoato de etilo, el 2-metil-butanoato de etilo y el hexanoato de etilo. Una de las enzimas implicadas en la formación de estos ésteres es la alcohol acil transferasa (AAT) que cataliza la transferencia del grupo acilo desde un acil-CoA a un alcohol. La AAT de fresa ha sido parcialmente purificada y caracterizada, y se ha demostrado que puede utilizar como sustrato acil-CoA tanto al acetil-CoA (100%), como al butil-CoA (70%) y el propil-CoA (20%); y, como sustrato alcohol preferido, al hexanol (Pérez *et al.*, 1993; Olías *et al.*, 1995). Recientemente, mediante el análisis de su expresión cuantitativa por técnicas de *microarrays*, se ha demostrado que la SAAT de fresa se expresa 16 veces más en fruto rojo que en fruto verde, lo que sugiere que cataliza los pasos finales de la síntesis de ésteres volátiles en este fruto (Aharoni *et al.*, 2000). Así, la expresión del gen de la SAAT, que es específica de receptáculo, sólo se detecta en frutos en proceso de maduración, alcanzando su valor máximo de actividad en frutos completamente maduros (Pérez *et al.*, 1996). La expresión del gen comienza en el estadio blanco del fruto, antes de la formación de ésteres volátiles detectables por cromatografía, y continúa aumentando en el estadio intermedio hasta alcanzar su máximo de expresión en el estadio rojo, lo que coincide con los niveles mayores de ésteres volátiles presentes en el fruto (Aharoni *et al.*, 2000). La

enzima SAAT utiliza preferentemente alcoholes alifáticos de cadena media en combinación con diferentes acil-CoA como sustrato, de hecho su actividad resultó insignificante con alcoholes aromáticos y monoterpénol linalol como sustratos. En *Fragaria vesca* se ha aislado e identificado una proteína AAT (VAAT) (Beekwilder *et al.*, 2004) cuya expresión heteróloga muestra una actividad muy distinta a la SAAT. De hecho, VAAT es mucho más activa cuando utiliza como sustrato alcoholes de cadena corta, al contrario que la SAAT. En general, todos los datos disponibles sugieren que los volátiles presentes en cada especie están determinados en gran medida por el suministro de precursores.

Recientemente, ha sido caracterizada otra acil transferasa, FaAAT2, implicada en la biogénesis del aroma del fruto de fresa (Cumplido-Laso *et al.*, 2012). Esta alcohol acil transferasa presenta un patrón de expresión génica durante el crecimiento y la maduración del fruto asociado a la producción de ésteres. La enzima FaAAT2 semi-purificada presenta actividad con alcoholes C1-C8 de cadena lineal y alcoholes aromáticos en presencia de acetyl-CoA. El alcohol de cinamilo fue el aceptor de acilo más eficiente. El silenciamiento transitorio en el receptáculo del fruto de fresa por agroinfiltración de la expresión del gen *FaAAT2* redujo significativamente la producción de ésteres volátiles lo que sugiere que FaAAT2 juega un papel importante en la producción de ésteres que contribuyen al aroma final de la fresa (Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

También, se ha propuesto la participación de la enzima piruvato descarboxilasa (*FaPDC1*) en la generación del aroma del fruto maduro a través de su participación en la fermentación etanólica, ya que se ha comprobado que la expresión de este gen está asociada al proceso de maduración y está regulada por auxinas (Moyano *et al.*, 2004).

Otros compuestos que parecen intervenir en el aroma de la fresa son los terpenoides. Estos compuestos derivan de la vía del mevalonato y/o de la vía plastidial 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Ambas rutas producen compuestos de 5 C que pueden ser empleados por prenil transferasas en reacciones de condensación para producir geranilo difosfato (PIB), precursor de los monoterpénos, y farnesil difosfato (FDP), precursor de diterpenos y de carotenoides. El linalool, nerolidol, α -pineno y limoneno son terpenos volátiles predominantes en la fresa que pueden suponer hasta un 20% de los volátiles totales del fruto (Loughrin y Kasperbauer, 2002). Recientemente, se ha clonado y expresado una nerolidol sintasa (NES1) que genera como productos mono y sesquiterpenos (Aharoni *et al.*, 2004). La enzima recombinante FaNES1 forma (S)-linalol y trans-(S)-nerolidol del PIB y del FDP respectivamente. Este gen se expresa de forma específica y fuertemente en frutos de variedades cultivadas (octoploides) pero no en las silvestres, por lo que el linalool y nerolidol participan únicamente en la composición final del aroma del fruto de las variedades de fresa cultivadas (Aharoni *et al.*, 2004).

Así, se ha propuesto que el aroma de la fresa es el resultado de la combinación de los olores “afrutado” (etil-butanoato, etil-hexanoato y metil 2-metilbutanoato), “verde” (Z-3-hexenal), “dulce” (ácido butanoico y ácido 2-metilbutanoico), “melocotón” (decalactona), “caramelo” [4-hydroxy-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF, furaneol)], y 2,5-dietil-4-metoxi-3(2H)-furanona (DMMF)) (Pyysalo *et al.*, 1979; Larsen *et al.*, 1992). Entre todos estos compuestos volátiles destaca el HDMF por su elevada concentración y bajo olor umbral (Larsen *et al.*, 1992; Roscher *et al.*, 1997). Así, el HDMF aumenta su concentración a lo largo de la maduración alcanzando sus valores más elevados en frutos muy maduros (Pérez *et al.*, 1996). Sin embargo, el HDMF es rápidamente metabolizado a β -D-glucopiranosido y, por tanto, a su derivado HDMF-glucósido (Roscher *et al.*, 1998).

Se ha comprobado también que genes que codifican una terpeno sintasa (sintasa pineno, PINS) en variedades silvestres de fresa presentan una expresión reducida en especies cultivadas, probablemente debido a la presencia de una mutación por inserción (Aharoni *et al.*, 2004). Así, en *Fragaria vesca*, la enzima FvPINS produce α -pineno que actúa como sustrato de una hidroxilasa pineno que cataliza la hidroxilación del C10 del α -pineno para obtener mirtenol. Por el contrario, en *Fragaria* \times *ananassa*, la ausencia de α -pineno que se pueda utilizar como sustrato para la obtención de mirtenol y acetato de myrtenyl, produce cambios en el sabor de la fruta (Aharoni *et al.*, 2004), lo que demuestra que mutaciones simples pueden ser determinantes del sabor del fruto entre los diferentes cultivares de fresa.

Otros compuestos, como ácidos grasos volátiles (p.e. 2-metilol acetato) que incrementan su concentración durante la maduración, juegan un papel importante en el aroma de la fresa (Dirinck *et al.*, 1981; Yamashita *et al.*, 1977). Además, se han descrito varios compuestos sulfurados relacionados con el aroma del fruto a pesar de encontrarse a concentraciones inferiores a la de otros compuestos volátiles (Dirinck *et al.*, 1981).

El elevado número de compuestos relacionados con el aroma en el fruto de fresa sugiere que las enzimas involucradas podrían ser multifuncionales, lo que evitaría un gasto extra de energía para la síntesis de proteínas nuevas. No obstante, esto también podría ser un reflejo de la falta de especificidad de enzimas como reductasas, esterasas, oxidasas, etc., implicadas en la producción de numerosos compuestos involucrados en el aroma del fruto.

Tabla 4: Compuestos más representativos que intervienen en el aroma del fruto de fresa
(Adaptado de Hancock, 1999).

<i>Familia Química</i>	<i>Compuestos representativos</i>
Ésteres de bajo peso molecular	Etil butanoato
	Etil hexanoato
	Hexil acetato
	Isoamil acetato
Cetonas	2-Heptanona
	3-Hidroxibutanoato
Terpenoides	Linalool
	α -Terpineol
Furanonas	Furaneol
Dionas de bajo peso molecular	Diacetil
Derivados bencénicos	Benzaldehido
Aldehídos insaturados	<i>t</i> -2-Hexenal
Aldehídos saturados	Hexanal
Alcoholes insaturados	<i>t</i> -2-Hexen-1-ol
Ésteres insaturados	<i>t</i> -2-Hexenil acetato
Furaldehídos	Furfural
Ácidos grasos volátiles	2-Metiltiol acetato
Ésteres tiólicos	Metiltiol acetato
Varios	Etil cinamato
	Naftaleno

4.2.2. Metabolismo de los fenilpropanoides: aparición del color

A lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa, se observa una transición desde el color verde inicial al color rojo propio de frutos completamente maduros. Este cambio de coloración se debe tanto a la degradación de clorofilas como a la síntesis *de novo* de antocianinas responsables de la coloración de los frutos maduros y localizadas en las vacuolas (Timberlake, 1981; Perkin-Veazie, 1995). La biosíntesis de antocianinas comienza en el fruto blanco (Woodward, 1972) y se produce a partir de fenilpropanoides y de flavonoides por la vía del ácido siquímico (Harbone, 1973). Mediante la unión de azúcares en diferentes posiciones a la molécula de antocianina se sintetizan los antocianos que, además, pueden acetilarse con distintos ácidos fenólicos para dar lugar a diferentes pigmentos. Así, en un fenómeno denominado co-pigmentación, las antocianinas forman complejos con las flavononas produciendo un efecto crómico que cubre el rango desde el rojo al azul (Asen *et al.*, 1972). La

antocianina predominante en fresa es la pelargonidina-3-glucósido (Wrolstad *et al.*, 1970; Green, 1971; Kalt *et al.*, 1993), que constituye el 88% de las antocianinas presentes en el fruto, aunque también se han detectado pelargonidina-glucósido y cianindina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995). La concentración total de antocianinas varía unas 16 veces en los diferentes cultivares, observándose también una cierta variación en su composición (Bakker *et al.*, 1994). Recientemente, todos estos metabolitos secundarios han adquirido mucha importancia debido a su capacidad de prevenir y proteger de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, cáncer, diabetes de tipo II y obesidad (Hannum, 2004; Seeram, 2008; Giampieri *et al.*, 2015).

Los fenilpropanoides se sintetizan a partir de fenilalanina por la acción secuencial de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), la ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H) y la *p*-cumarato:CoA ligasa (4CL). Estos compuestos actúan como sustratos en la síntesis de flavonoides y/o precursores de la lignina (Figura7). En etapas tempranas de maduración, la actividad PAL también se ha asociado con la síntesis de proantocianidinas (PA) (Cheng y Breen, 1991). La acumulación de pigmentos de antocianina es uno de los rasgos más importantes que convierte a la fresa en un producto atractivo para el consumidor. Existen cultivares donde la acumulación de antocianinas es un rasgo potenciado y se presenta asociado a una mayor expresión del gen *FaPAL6* (Pombo *et al.*, 2011). Corriente abajo en la ruta, aparece un grupo de enzimas multifuncionales involucradas en la biosíntesis de los fenilpropanoides y que corresponde a la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la cumarílico CoA reductasa (CCR), implicadas ambas en la biosíntesis de monolignoles y en la lignificación del sistema vascular, lo que repercute directamente en la firmeza de la fruta (Anterola *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2002). Otros compuestos descritos recientemente en frutos de fresa han sido los isómeros *cis* y *trans*-resveratrol (estilbenos) (Wang *et al.*, 2007). Se ha comprobado que se acumulan preferentemente en receptáculo y que sus niveles podrían verse afectados tanto por el genotipo como por las condiciones ambientales (Wang *et al.*, 2007).

Los niveles y la composición cualitativa de los flavonoides en frutos de fresa dependen de factores genéticos, ambientales y de desarrollo, así como de la manipulación que sufren los frutos tras su recogida, así como de la temperatura y calidad del aire durante su almacenamiento postcosecha (Bakker *et al.*, 1994; Häkkinen y Törrönen, 2000; Wang y Lin, 2000; Anttonen *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008; Dragišić Maksimović *et al.*, 2015). Debido al cambio de color asociado a la biosíntesis de antocianinas, la vía de los flavonoides se utiliza para estudios funcionales en receptáculo de fruto de fresa. Así, entre los 10-12 días después de la antesis, se observa un primer pico de expresión y actividad enzimática asociado a la síntesis de compuestos derivados del flavan-3-ol y, unos 15-20 días más tarde, se aprecia un segundo pico de expresión que está relacionado con el incremento de la síntesis de antocianos en frutos

completamente desarrollados, principalmente pelargonidina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995).

Las primeras reacciones de la ruta de biosíntesis de flavonoides son catalizadas por la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Figura7). Debido a su posición clave en el inicio de la ruta, la CHS ha sido objeto de un amplio estudio en el fruto de fresa. Así, se ha comprobado que la inhibición de la expresión de la FaCHS bloquea la biosíntesis de flavonoides. Además, plantas con la expresión de *FaCHS* silenciada muestran niveles reducidos de antocianinas y de flavonoides, lo que indica un papel clave de esta enzima en la biosíntesis de estos compuestos (Lunkenbein *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito un incremento de la actividad de otras enzimas implicadas en la biosíntesis de antocianinas tales como la dihidroflavonol reductasa (DFR) (Moyano *et al.*, 1998; Hirner *et al.*, 2001; Miosic *et al.*, 2014), la O-metil transferasa (OMT) (Lunkenbein *et al.*, 2006), la flavonoide 3-hidroxilasa (F3H) o la chalcona reductasa (CHR) (Manning, 1998). La expresión de estos genes está regulada negativamente por la acción de las auxinas (Wilkinson *et al.*, 1995; Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998). Además, los genes correspondientes a la CHS, la F3H y la DFR presentan niveles elevados de expresión en los estadios verdes inmaduros (Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998), lo que sugiere una implicación adicional de los mismos en el metabolismo de otros compuestos fenólicos, como por ejemplo los taninos.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que el calcio puede aumentar la acumulación de antocianinas y fenoles totales en los receptáculos del fruto de fresa posiblemente a través de la regulación positiva de determinados genes estructurales de la ruta de biosíntesis de antocianinas, incluyendo flavonoide 3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR2), antocianidina sintasa (ANS) y UDP-glucosiltransferasa (UGT1) (Xu *et al.*, 2014). También ha sido demostrado el papel del jasmonato de metilo como promotor de la maduración de frutos de *Fragaria chiloensis* a través de su participación en la acumulación de antocianinas incrementando la expresión de varios genes relacionados con esta ruta (Concha *et al.*, 2013).

Los genes *FaMYB1* y *FaMYB10* codifican dos factores de transcripción de tipo MYB ambos relacionados con la acumulación de antocianinas en el fruto de fresa durante la maduración (Aharoni *et al.*, 2001; Lin-Wang *et al.*, 2010; Salvatierra *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). También, han sido descritos dos genes que codifican factores de transcripción de tipo MADS-box, *FaMADS9*, perteneciente al grupo *SEPALLATA* (Seymour *et al.*, 2011), y *FaSHP* (*SHATTERPROOF*) (Daminato *et al.*, 2013). Todos estos genes muestran un incremento de su expresión a lo largo del desarrollo y maduración del fruto de fresa, así como una clara regulación hormonal de su expresión, ya que se regulan negativamente por auxinas y

positivamente por ABA. La sobreexpresión de *FaMYB1* en hojas de tabaco (Aharoni *et al.*, 2001) dio lugar a la supresión de antocianinas, sugiriendo que *FaMYB1* actúa como represor de la transcripción y no como activador transcripcional. Por otra parte, el silenciamiento transitorio de *FaMYB10* en frutos de fresa mediante ARN interferente condujo a una reducción de la expresión de genes implicados en la producción de antocianinas y fenilpropanoides, así como del contenido de antocianinas en los mismos (Medina-Puche *et al.*, 2014). Además, la expresión de *FaMYB10* no está regulada por *FaMYB1* y viceversa (Medina-Puche *et al.*, 2014). En conjunto, estos datos indican que *FaMYB10* juega un papel regulador general en la ruta de los flavonoides/fenilpropanoides durante la maduración de la fresa. Por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento de *FaMADS9* también provocó una reducción en el contenido de antocianinas totales en el fruto de fresa maduro (Seymour *et al.*, 2011) y el silenciamiento de *FaSHP* produjo una reducción en los niveles de expresión del gen marcador *FaCHS* y de los genes *FaMYB1*, *FaMYB10* y *FaMADS9*, provocando un retraso en la coloración del fruto, así como una reducción en la expresión de otros genes marcadores implicados en otras rutas tales como *FaPG1*, *FaPL*, *FaEG1*, *FaPAL6* y *FaQR*. Recientemente, se ha identificado otro FT de tipo MYB, *FaGAMYB*, que desempeña un importante papel regulador en el inicio de la maduración del receptáculo del fruto de fresa, actuando corriente arriba del ABA (Vallarino *et al.*, 2015). El silenciamiento transitorio de *FaGAMYB* provocó una detención en la maduración del fruto e inhibió la aparición del color rojo característico del fruto de fresa. En consonancia con este efecto, varios FTs asociados con la ruta de biosíntesis de flavonoides mostraron su expresión alterada y además se cuantificó una reducción de la biosíntesis de ABA y del contenido de sacarosa (Vallarino *et al.*, 2015). Curiosamente, la aplicación exógena de ABA rescató este fenotipo (Vallarino *et al.*, 2015).

Además, se han identificado en fresa otros TFs relacionados con la biosíntesis de flavonoides: tres de la familia de genes *myb*, cuatro de la familia del gen *myc* (bHLH) y un factor de transcripción WD-40 (Baudry *et al.*, 2004). Estos genes son homólogos a otros TFs implicados en la biosíntesis de flavonoides en otras especies y muestran un patrón de expresión paralelo a la acumulación de flavonoides durante el desarrollo del fruto de fresa (Baudry *et al.*, 2004). En *Arabidopsis thaliana* la expresión de los genes de biosíntesis de proantocianidinas es inducida específicamente por un complejo de proteínas ternario, compuesto de *AtTT2* (*AtMYB123*), *AtTT8* (*AtbHLH042*) y *AtTTG1* (proteína WD40). Se empleó una aproximación metodológica que combinaba doble híbrido de levadura con aglomeración y agrupación jerárquica de datos de transcriptómica y metabolómica para identificar reguladores de proantocianidinas en fresa. Entre los genes candidatos aislados, cuatro eran similares a *AtTT2*, *AtTT8* y *AtTTG1* (*FaMYB9* / *FaMYB11*, *FabHLH3* y *FaTTG1*, respectivamente) y dos codifican putativos reguladores negativos (*FaMYB5* y *FabHLH3Δ*) (Schaart *et al.*, 2013). Además, *FaMYB9*/*FaMYB11*,

FabHLH3 y FaTTG1 eran capaces de complementar los mutantes testa transparentes *tt2-1*, *tt8-3* y *ttg1-1*, respectivamente, así como de *trans*-activar el promotor de la antocianidina reductasa de *Arabidopsis* (Schaart *et al.*, 2013). Pillet *et al.* (2015) usando el análisis de redes de co-expresión del transcriptoma (TCNA; transcriptome co-expression network analysis) acoplado a ensayos de expresión transitoria en frutos de fresa, han identificado nuevos FTs candidatos (FaTCP11, PCL1-like and FaSCL8) reguladores de nodos específicos de la vía de flavonoides. Estos hallazgos proporcionan nuevas herramientas para modificar el contenido de proantocianidinas y la calidad del fruto de fresa y a su vez este enfoque podría proporcionar una solución técnica para dilucidar rutas de interés no tan bien caracterizadas hasta el momento.

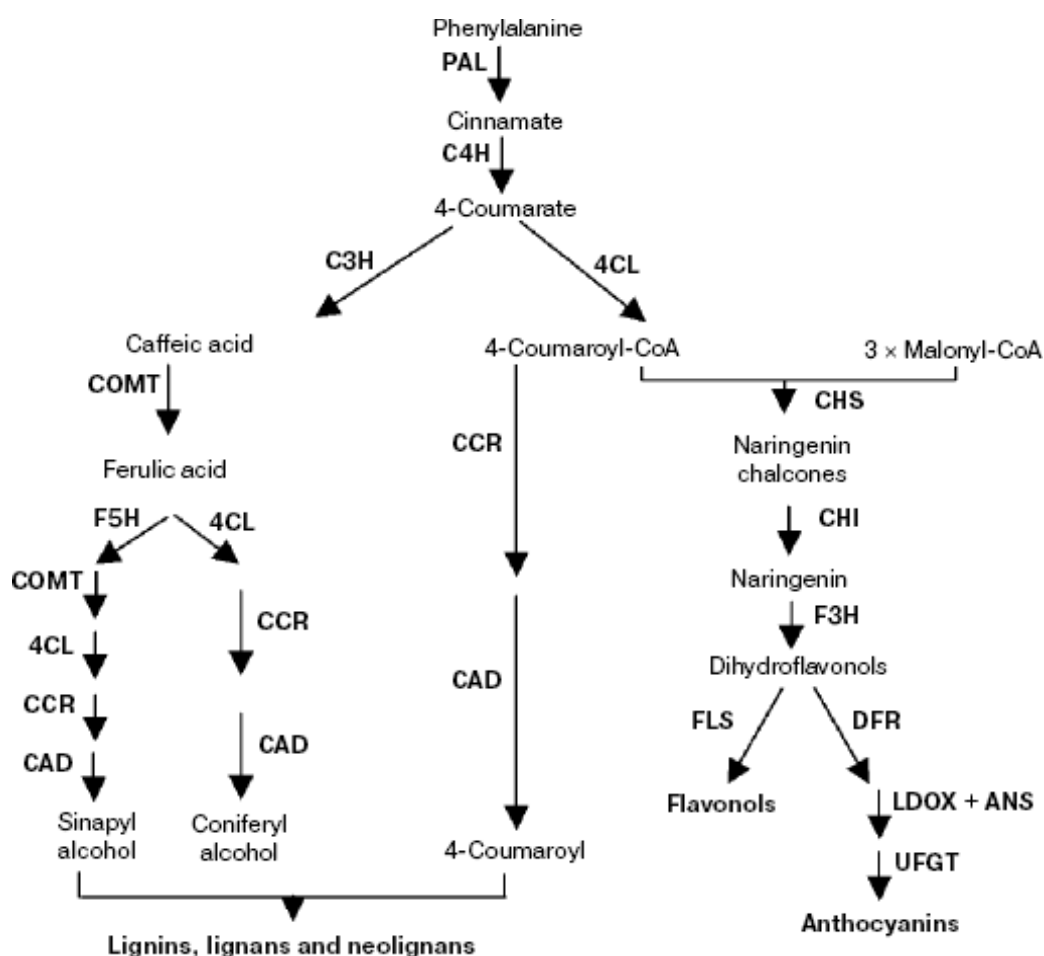


Figura7: Diagrama de las rutas de biosíntesis comprometidas con el metabolismo de los fenilpropanoides. (Extraído de Du *et al.*, 2009).

4.3. Respiración

Los frutos se clasifican en climatéricos y no-climatéricos, dependiendo del modelo de respiración que presentan durante su proceso de maduración (Figura8).

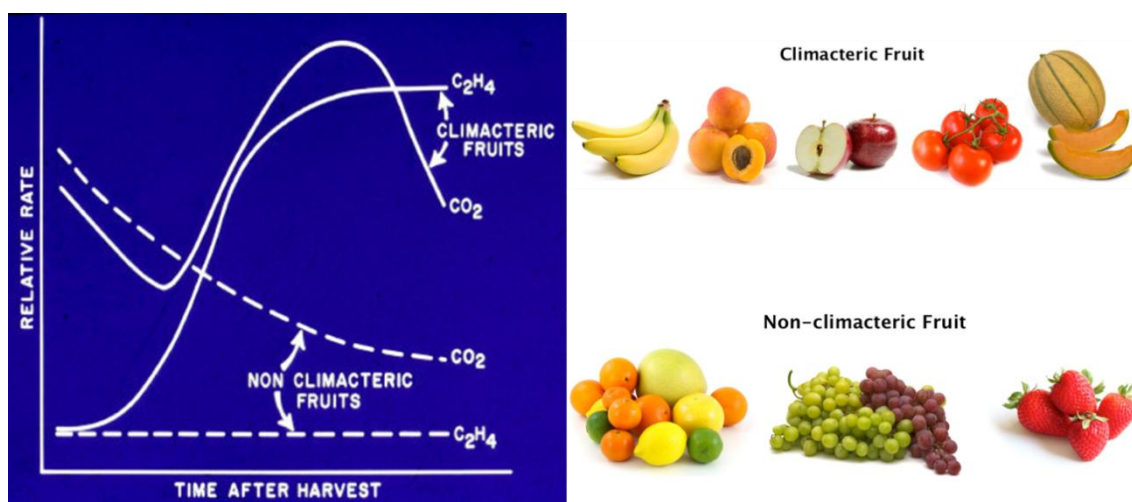


Figura 8: Gráfica comparativa de la producción de etileno y la respiración durante la maduración de frutos climatéricos y no climatéricos.

Los frutos climatéricos, tales como tomate, plátano, mango, manzana y aguacate, presentan un pico característico en la producción de etileno y en su actividad respiratoria al inicio de la maduración (Seymour *et al.*, 1993; Tucker, 1993; Adams-Phillips *et al.*, 2004; Zaharah *et al.*, 2011) (Figura 8). Esta explosión en la producción de etileno se deriva de una regulación de genes de la biosíntesis de etileno en el inicio de la maduración, lo que resulta en la producción autocatalítica de etileno y una sobre-regulación de los componentes de la percepción de etileno y señalización (Klee y Clark, 2004). Además, en el modelo de respiración climatérico, aparece un pico típico de respiración cuando éstos se tratan con etileno exógeno, mientras que este fenómeno no sucede en frutos no-climatéricos tales como cítricos, uva y fresa. Por otro lado, en el caso de frutos climatéricos, el aumento de la biosíntesis de etileno endógeno está asociado a cambios típicos del proceso de maduración tales como el reblandecimiento, síntesis de pigmentos y cambios en el color del fruto, defensa frente a patógenos, degradación de clorofilas y cambios en la composición nutricional (Hobson y Grierson, 1993; Tucker, 1993; Alexander y Grierson, 2002; Giovannoni, 2004). En contraste con los frutos climatéricos, el control hormonal de la maduración de los frutos no-climatéricos y en concreto de la fresa, presentan una regulación hormonal diferente, gobernada fundamentalmente por el ácido abscísico (Jia *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012; Cherian *et al.*, 2014).

Por definición, los frutos no-climatéricos no presentan un pico en los niveles de etileno o en la respiración durante la maduración del fruto (Seymour *et al.*, 1993) (Figura 8), aunque se han obtenido evidencias de un incremento transitorio en los niveles endógenos de etileno antes del envero de la uva por lo que no se puede descartar que el etileno juegue un papel durante el desarrollo de las bayas de uva (Chervin *et al.*, 2004). No obstante, en frutos no-climatéricos, todos los cambios asociados a la maduración del fruto suceden sin que se detecte un incremento

significativo de la producción de etileno, lo que parece indicar que este proceso es independiente de dicha hormona (Villareal *et al.*, 2009).

Por consiguiente, con respecto al modelo de respiración, el proceso de maduración del fruto puede pertenecer a tres tipos de modelo (Iwata *et al.*, 1969a y 1969b):

- Frutos en los que la respiración desciende gradualmente durante la maduración, como en el caso de la naranja.
- Frutos en los que los índices de respiración aumentan continuamente hasta la maduración completa, incluso después del pico de respiración típico de frutos climatéricos, como en el caso del tomate.
- Frutos en los que la respiración es máxima en la transición entre los estadios maduros a sobremaduros, como en el caso de la fresa.

Se ha propuesto que la respiración climatérica aporta energía metabólica adicional. Sin embargo, la fresa, un fruto no climatérico, muestra una intensa fase de maduración que no presenta un requerimiento aparente de energía metabólica adicional. No obstante, en frutos de fresa se ha descrito un aumento de la actividad ATPasa de tres veces en base al peso fresco entre los estadios verde y rojo maduro, lo que sugiere que podría requerirse energía extra para los procesos de transporte que se producen durante esta fase de desarrollo (Ben-Arie y Faust, 1980).

4.4. Choque oxidativo

Mediante la utilización de *microarrays* aplicados al estudio del proceso de maduración del fruto de fresa, se ha observado un incremento de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo durante este proceso y viceversa (Aharoni *et al.*, 2002a). Por ello, se ha propuesto que el programa transcripcional asociado a la maduración del fruto de fresa podría ser parcialmente inducido por el estrés oxidativo generado durante la lignificación de los haces vasculares del fruto en los estadios de maduración del mismo (Aharoni *et al.*, 2002a).

En tomate, se ha observado que durante su proceso de maduración y, concretamente en el estadio blanco-intermedio, se incrementan los índices indicativos de procesos oxidativos como el contenido en peróxido de hidrógeno, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Jiménez *et al.*, 2002). En otros frutos, como pera y piña, se ha descrito durante la maduración un incremento del nivel de transcrito correspondiente a un gran número de genes que codifican proteínas antioxidantes y enzimas de la ruta de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que apoya la hipótesis de que durante este proceso se produce un fenómeno oxidativo

que requiere un equilibrio entre la producción y eliminación de ROS por los sistemas antioxidantes (Fonseca *et al.*, 2004; Moyle *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha observado ninguna modificación en los niveles de transcrito de genes involucrados en estrés oxidativo durante la maduración del fruto de la uva (Terrier *et al.*, 2005). En fresa, se ha observado un incremento de la producción de anión superóxido (O_2^-) a lo largo del proceso de maduración del fruto (López-Ráez *et al.*, 2003). Posteriormente, una UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase (FaGT2) fue identificada y caracterizada como un enzima multifuncional implicada en el metabolismo de compuestos naturales y xenobióticos en *F. ananassa* (Landmann *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo sugieren que FaGT2 participa en la detoxificación de compuestos xenobióticos de acuerdo con la inducción de la expresión del gen *FaGT2* bajo condiciones de estrés oxidativo (Landmann *et al.*, 2007). Además, la expresión del gen *FaGAST2* también aumentó en condiciones de estrés oxidativo (bajo tratamientos con H_2O_2 o tras la infección con *Colletotrichum acutatum*), lo que sugiere un papel directo para la proteína FaGAST2 en la eliminación de especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento y maduración del fruto y durante la infección fúngica (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

5. Regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa

A lo largo del desarrollo y maduración de los frutos se producen cambios en las concentraciones de hormonas en los mismos (Figura9). Las variaciones en las concentraciones hormonales en las semillas y sus tejidos circundantes son las que determinan el programa de desarrollo y maduración del fruto. Múltiples estudios han demostrado que durante la formación del fruto se incrementa el contenido de auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides, y que auxinas, giberelinas y brasinoesteroides intervienen en el crecimiento del fruto. Para desencadenar la maduración del fruto se produce una inhibición del transporte de auxinas desde las semillas y un incremento de ABA. Esto dispara el programa de maduración y senescencia que conduce a un incremento de ABA y/o etileno y su respuesta en tejidos circundantes. Todos los frutos parecen que responden a ABA y etileno. Históricamente se consideran frutos climatéricos aquellos cuya maduración es regulada por ABA indirectamente a través del etileno. En frutos no climatéricos, el ABA juega un papel más dominante pero mantienen caracteres de la maduración dependientes del etileno (McAtee *et al.*, 2013; y referencias en él contenidas).

La regulación hormonal del desarrollo y maduración de la fresa es uno de los procesos más estudiados en los frutos blandos. La estructura única de este fruto, con los aquenios en el exterior del receptáculo, lo han hecho un sistema muy útil para estudiar el papel de éstos en el desarrollo, ya que se pueden eliminar fácilmente causando poco daño físico al resto del fruto.

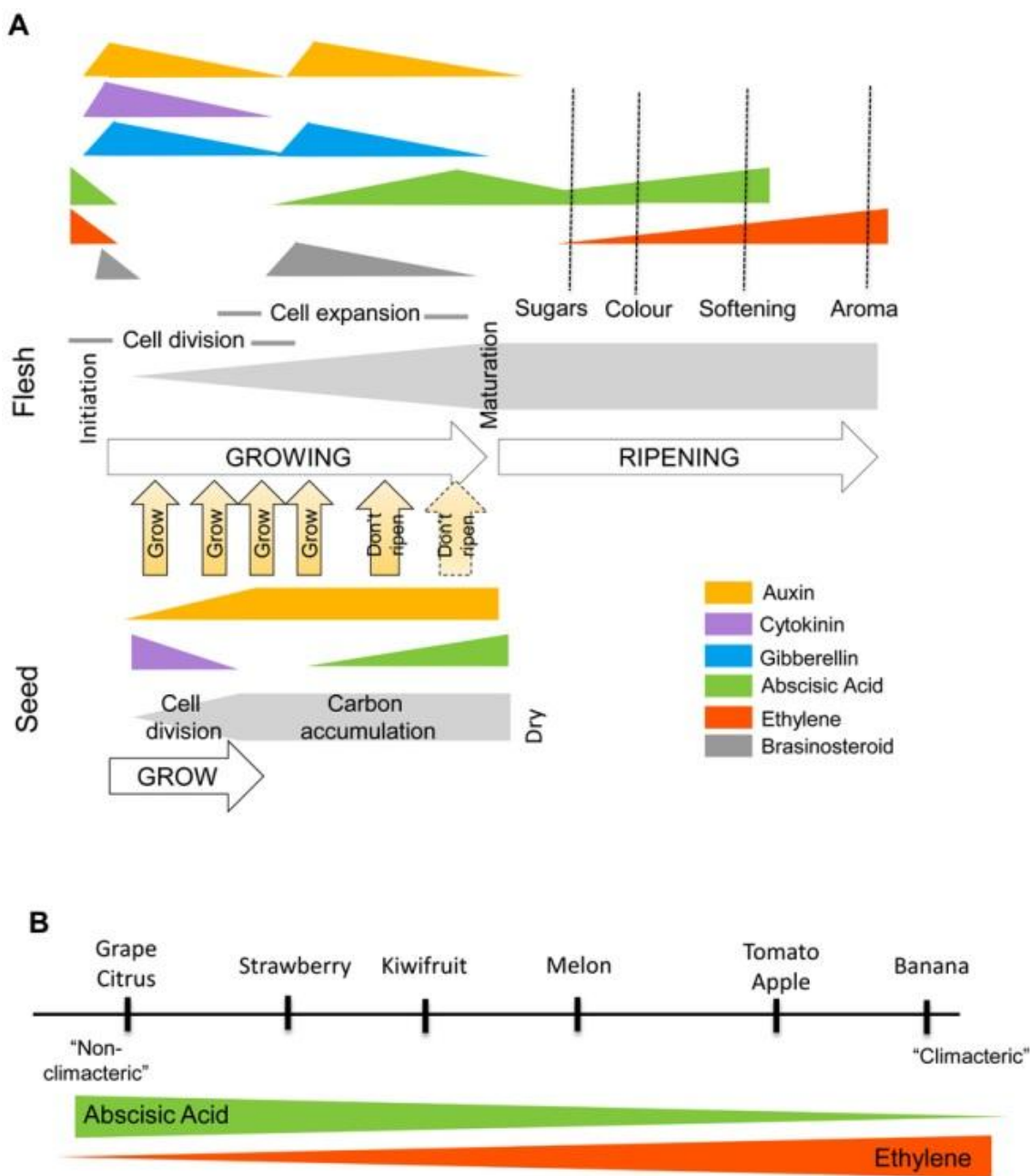


Figura9: A. Cambios hormonales que suceden en un fruto genérico durante el desarrollo y maduración. B. Espectro de dependencias al ABA y al etileno en la maduración.
(Extraído de McAtee *et al.*, 2013).

5.1. Auxinas

Durante la etapa de desarrollo del fruto, en los achenios tiene lugar la síntesis de la auxina ácido 3-indol acético (IAA), que es exportada al receptáculo (Nitsch, 1950). El análisis de los niveles de IAA en el fruto de fresa constató que el IAA libre, considerado como la forma activa de la hormona, es la forma predominante en achenios y presenta un nivel máximo de 3 µg/g de peso seco a los diez días post-antesis (Dreher y Poovaiah, 1982). De esta cantidad, menos del 1% está

88
"Functional characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa*) transcription factors and transcriptional regulator during the fruit ripening, and genes with biotechnological interest"

presente en el receptáculo en el mismo estadio de desarrollo. Además, se ha encontrado que el IAA conjugado por enlaces tipo amida es la principal forma de IAA presente en el receptáculo. No obstante, otros estudios han encontrado en el tejido del receptáculo niveles sustancialmente mayores de IAA libre y conjugado que los descritos por Dreher y Poovaiah (1982) (Archbold y Dennis, 1984; Park *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que los niveles de IAA unido por enlace tipo amida presentan una distribución bimodal con un pico de concentración en el receptáculo a los 11 días seguido de un descenso y una posterior acumulación en los últimos estadios de maduración del fruto (Archbold y Dennis, 1984).

Aunque el crecimiento del receptáculo aún no ha podido relacionarse totalmente con los niveles endógenos de auxinas en el propio receptáculo ni en aquenios, sí se sabe que éstos juegan un papel fundamental en el desarrollo del fruto. Los niveles elevados de IAA conjugado tipo éster presentes en aquenios jóvenes pueden servir como fuente de IAA durante el desarrollo del aquenio, suplementando al IAA sintetizado *de novo*. La acumulación en los aquenios de IAA conjugado tipo amida podría ser debido a un producto final del metabolismo del IAA o bien a una forma de almacenamiento del mismo para ser utilizado como una fuente de IAA libre durante la germinación de las semillas. Los estudios realizados con IAA marcado y suministrado exógenamente han demostrado que el IAA libre es capaz de conjugarse en glucosa-IAA y aspartato-IAA (Lis, 1974).

Las auxinas pueden inhibir la maduración en muchos frutos no-climatéricos (Trainotti *et al.*, 2005). En fresa, Given *et al.* (1988b) propusieron que las auxinas producidas por los aquenios inhiben la maduración en los frutos en estadio verde. A medida que el fruto se desarrolla, el nivel de las auxinas en los aquenios va declinando, lo que implica que en el receptáculo se produce un descenso en la concentración de IAA hasta un nivel crítico que permite que se desencadene el proceso de maduración (Manning, 1993; Symons *et al.*, 2012). Por lo tanto, las auxinas estimularían la elongación del fruto mientras que reprimirían la maduración del mismo. De este modo, al retirar los aquenios de la superficie promovemos la maduración, mientras que tratamientos con auxinas sintéticas dan resultados opuestos (Given *et al.*, 1993; Manning, 1993). En uva, también se ha descrito que las auxinas actúan como inhibidores de la maduración. En este caso el tratamiento con ácido benzotiazol-2-oxiacético, una auxina sintética, retrasó tanto el proceso de maduración como el incremento de los niveles de ABA endógenos asociado a dicho proceso (Davies *et al.*, 1997), sugiriendo que auxinas y ABA pueden interactuar para controlar la maduración.

Se han descrito numerosos genes involucrados en los procesos metabólicos asociados a la maduración del fruto de fresa y cuya expresión se ve inducida en frutos verdes tras la retirada de

los aquenios, como por ejemplo los genes que codifican las enzimas dihidroflavonol reductasa (*FaDFR*) (Moyano *et al.*, 1998; Halbwirth *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007), pectato liasas (*Fapl*) (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003), endoglucanasas (*FaEGs*) (Harpster *et al.*, 1997; Manning, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001; Spolaore *et al.*, 2003; Palomer *et al.*, 2006), así como los genes *Famyb2*, *FaQR*, *FaHyPRP*, *Fapmsr*, *Faufgt* y *Fa4cl* (Blanco-Portales *et al.*, 2003; López-Ráez *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006; Lunkenbein *et al.*, 2006a; Raab *et al.*, 2006), y recientemente *FaAAT2* (Cumplido-Laso *et al.*, 2012), *FaRGLyase1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) y *FaNIP1;1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015). No obstante, hay genes relacionados con la maduración que no se ven afectados por las auxinas, por ejemplo, el gen *FaExp2* que codifica una expansina de pared celular (Aharoni *et al.*, 2002b) y el gen *FaGAST2*, relacionado con la determinación del tamaño de las células del receptáculo del fruto de fresa durante el desarrollo y la maduración del mismo (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Por el contrario, han sido identificados genes de tipo *Aux/IAA* activados transcripcionalmente por las auxinas durante las primeras etapas de desarrollo del fruto de fresa, en concreto *FaAux/IAA1* y *FaAux/IAA2* (Liu *et al.*, 2011).

La sugerencia de que la concentración de auxinas podría ser el principal factor hormonal que influye en la maduración del fruto de fresa se ve apoyada por la ausencia de cualquier tipo de relación del etileno con este proceso. Esta falta de relación se deduce de la pobre producción de etileno endógeno (Knee *et al.*, 1977; Abeles y Takeda, 1990), la falta de respuesta a la aplicación de etileno exógeno (Hoad *et al.*, 1971; Iwata *et al.*, 1969b), y por la falta de sensibilidad mostrada frente a inhibidores de la síntesis del etileno. Todo esto no excluye la existencia de otros factores que intervengan en la maduración, ya que se conoce el efecto enrojecedor sobre el fruto de fresa de compuestos como el ácido fumárico, ácidos de frutas y monofenoles (Guttridge *et al.*, 1977).

5.2. Giberelinas y citoquininas

Aunque las auxinas son las hormonas que dominan el proceso de crecimiento y desarrollo de la fresa, sus efectos pueden ser modificados por otras fitohormonas presentes también en el fruto (Lis *et al.*, 1978). Las giberelinas (GAs) son compuestos tetracíclicos diterpenoides implicados en la regulación de muchos procesos del desarrollo que tienen lugar durante el ciclo de vida de la planta, tales como germinación de semillas, división celular y elongación, inducción floral y desarrollo y crecimiento del fruto (Pharis y King, 1985; Serrani *et al.*, 2007). Más de 100 GAs diferentes han sido identificadas en plantas; sin embargo, sólo unas pocas de ellas son biológicamente activas (GA_1 , GA_3 y GA_4) (Olszewski *et al.*, 2002).

La giberelina GA₃ no estimula el crecimiento del fruto cuando se aplica a frutos a los que se les han retirado los achenios (Archbold y Dennis, 1984), sin embargo, se ha comprobado que actúa de forma sinérgica con la 1-naftalenacetamida (1-NAAM) en frutos intactos cultivados *in vitro* promoviendo su crecimiento y maduración (Kano y Asahira, 1978). También se ha demostrado que la citoquinina N6-benciladenina (BA) suprime el crecimiento y maduración en conjunción con 1-NAAM. La actividad máxima de citoquininas y giberelinas ha sido detectada 7 días después de la antesis, concentrándose principalmente en achenios. Transcurrido este tiempo, la concentración de citoquininas disminuye en achenios y receptáculos manteniendo niveles basales hasta que el fruto está maduro (Lis *et al.*, 1978). Por otro lado, se ha comprobado que la kinetina no induce crecimiento en tejidos cultivados de fresa, ni aplicada a frutos intactos (Lis y Antoszewski, 1979). Por lo tanto, las auxinas son las hormonas que dominan el proceso de crecimiento y desarrollo, aunque dichos efectos pueden ser modificados por otras sustancias presentes también en el fruto.

La aplicación de GA₃ a frutos maduros provoca un significativo retraso en el desarrollo del color rojo característico de los frutos de fresa, probablemente como resultado de un retraso en el incremento de expresión de PAL, clorofilasa y actividades peroxidasas (Martínez *et al.*, 1996). Recientemente, se ha demostrado que tras la aplicación en frutos de fresa de GA₃ exógena se incrementó la expresión de varios genes, como *FaGAST* que codifica para una proteína implicada en la elongación celular y el tamaño final del fruto (de la Fuente *et al.*, 2006) y *FaXyl* que codifica para una β -xilosidasa (Bustamante *et al.*, 2009). Hytönen *et al.* (2009) han propuesto que las GAs podrían controlar la inducción de la división celular en los tejidos subapicales de las yemas axilares y actuar como una señal para determinar el destino del brote. Además, también han observado que las GAs parecen intervenir en la diferenciación de las yemas axilares regulada por el fotoperíodo. Por otra parte, recientemente también se ha sugerido un papel importante de las GAs en el desarrollo del receptáculo del fruto de fresa, detectando niveles extremadamente altos de GA₄ (Csukasi *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha considerado que el efecto de la temperatura en el desarrollo de los achenios podría estar relacionado con la actividad de las citoquininas sintetizadas en éstos. De esta forma, la maduración de los frutos que crecen a temperaturas bajas estaría retrasada debido a la alta concentración de citoquininas presente en los achenios y por un desarrollo ralentizado de los mismos (Kano y Asahira, 1979). También, se ha demostrado que las variaciones de la concentración de citoquininas durante el proceso de inducción floral son importantes en el proceso de floración en plantas de fresa (Eshghi y Tafazoli, 2007). Yamasaki y Yamashita (1993) estudiaron los cambios en la concentración de citoquininas endógenas en la corona de flores de fresa inducidos en condiciones de noche fría y día corto. Observaron que un aumento

del nivel de zeatina y una disminución de la zeatina ribósido justo antes de la iniciación floral, junto con el incremento específico de ribósido zeatina justo después de la iniciación, producía la inducción de flores en plantas de fresa. Estos resultados sugieren que los cambios en la actividad de ribósido zeatina y zeatina juegan un papel importante en la iniciación y el desarrollo floral (Yamasaki y Yamashita, 1993).

5.3. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona relacionada con el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se ha descrito su participación en el proceso de maduración de la semilla, en la adquisición de tolerancia a la senescencia y en la dormancia. Además, durante el crecimiento vegetativo, el ABA es la hormona clave en las respuestas fisiológicas que confieren tolerancia al estrés hídrico (sequía) y osmótico (altos niveles de salinidad) (Mishra *et al.*, 2006), permitiendo que las plantas puedan colonizar nichos ecológicos donde la disponibilidad de agua está limitada o es esporádica. De hecho, se ha comprobado en varias especies de plantas que la concentración endógena de ABA incrementa más de 10 veces a pocas horas de producirse situaciones de estrés hídrico y que decrece a sus niveles basales con la posterior rehidratación de la planta (Gomez-Cadenas *et al.*, 1996). Parece ser que el incremento de los niveles de ABA durante situaciones de estrés hídrico estimula el cierre de los estomas e inhibe su apertura, lo que resulta vital para evitar la pérdida de agua y el mantenimiento del estado de hidratación de la planta (Mishra *et al.*, 2006). Con el problema medioambiental de escasez de agua que se prevé para el siglo XXI, la modificación de la biosíntesis y del proceso de captación de ABA se presenta como un objetivo de estudio de gran interés para potenciar la resistencia de los cultivos a la sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Leng *et al.*, 2014).

Por otra parte, el ABA también parece estar involucrado en el retraso del crecimiento detectado en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico a través de la restricción de la producción de etileno. Es muy probable que esta interacción hormonal sea relevante en otras respuestas a estreses de plantas en las que se encuentre envuelto el etileno (Sharp, 2002). Además, el ABA controla ciertas funciones fisiológicas o de desarrollo en situaciones normales de la planta. Así, se ha descrito que las plantas deficientes en ABA muestran un fenotipo anormal, incluso en condiciones de buen riego (Wasilewska *et al.*, 2008). Paralelamente, estudios recientes han revelado que esta hormona es también activa en respuesta a estreses bióticos dependientes de patógenos (Fan *et al.*, 2009; Lim and Lee, 2015). En fresa, se ha observado que el ABA se acumula tanto en achenios como en receptáculos a los 20 días postantesis (Archbold y Dennis, 1984). Este aumento es simultáneo al descenso del nivel de IAA en ambos tejidos, por ello se ha propuesto que la relación ABA/IAA podría ser suficiente para dirigir el cambio genético que

ocurre durante la transición de elongación a maduración del fruto (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Además, se ha comprobado que la aplicación de ABA exógeno acelera la maduración en receptáculos cultivados *in vitro* (Kano y Asahira, 1981). No obstante, estos resultados obtenidos *in vitro* deben ser interpretados con precaución puesto que los frutos cortados no llegan a alcanzar el tamaño total y su crecimiento es mucho más lento que cuando se produce en la planta.

Mediante el uso de diferentes tratamientos y técnicas como el silenciamiento génico, recientemente se han aportado pruebas que apoyan la idea de que el ABA desempeña un papel crucial en la regulación de la maduración del fruto de fresa. La aplicación de ABA exógeno promovió la maduración del fruto de fresa, mientras que la administración de ácido nordihidroguaiarético (NDGA), un inhibidor de la biosíntesis de ABA, la retrasó (Jia *et al.*, 2011). Además, se comprobó que el silenciamiento del gen *FaNCED1*, que codifica una proteína clave en la biosíntesis de ABA, redujo la concentración de ABA endógeno del fruto de fresa generando frutos transgénicos con una reducción evidente del color debido a la inhibición de su maduración. No obstante, dicho fenotipo se revertió mediante la aplicación de ABA exógeno lo que parece sugerir que el ABA promueve la maduración del fruto de fresa (Jia *et al.*, 2011).

5.4. Etileno

En el fruto de fresa, la producción de etileno presenta un máximo en el estadio verde descendiendo su nivel hasta el día 20 tras la anthesis. Dicho descenso se correlaciona con la transición del fruto de estadio verde al estadio blanco de maduración. A continuación, se observa un nuevo aumento de su producción que alcanza su máximo en el estadio maduro (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Este descenso transitorio en la producción de etileno al comienzo del proceso de maduración del fruto podría deberse a la compartimentación del 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), precursor del etileno. No obstante, también podría ser debido a un descenso en las actividades ACC sintasa o ACC oxidasa (ACO), responsables ambas de la síntesis de esta fitohormona (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Recientemente, se ha descrito que el patrón de expresión del gen *FaACO1* coincide con la acumulación de esta fitohormona durante el proceso de maduración (Trainotti *et al.*, 2005). Por otra parte, aunque en frutos escindidos y tratados con ACC se incrementó la producción de etileno junto con el peso fresco y la acumulación de antocianinas, no se observó ningún cambio en la respiración (Perkins-Veazie *et al.*, 1996). Se ha descrito también que la aplicación exógena de etileno en frutos de fresa acelera su proceso de senescencia (El-Kazzaz *et al.*, 1983), mientras que el inhibidor de la percepción del etileno, el 1-metil ciclopropeno (1-MPC), mantiene la

firmeza del fruto y reduce la acumulación de antocianinas y del contenido en compuestos fenólicos del fruto en postcosecha (Jiang *et al.*, 2001; Villareal *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que la pequeña cantidad de etileno producida durante el proceso de maduración de la fresa podría ser suficiente para desencadenar algunos de los procesos fisiológicos relacionados con la maduración de este fruto (Trainotti *et al.*, 2005; Villareal *et al.*, 2010; Merchante *et al.*, 2013); de hecho, se ha observado la presencia de receptores de etileno de tipo-II codificados por el gen *FaEtr2* en el fruto de fresa (Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Iannetta *et al.*, 2000; Leshem y Pinchasov, 2000).

En fresa se ha observado que el etileno reprime la expresión de los genes que codifican una pectín metilesterasa (*FaPE1*) (Castillejo *et al.*, 2004), una galactosidasa (*FaEG3*) (Trainotti *et al.*, 2001; Balogh *et al.*, 2005) y una β -xilosidasa (*FaXyl1*) (Villareal *et al.*, 2010), mientras que no se modifica la expresión de otros genes también relacionados con la degradación de la pared celular como es el caso de los genes *FaExp2* y *FaCell*, que codifican una expansina y una celulasa respectivamente (Civello *et al.*, 1999). Además, se han clonado tres genes de fresa diferentes que codifican receptores de etileno (*FaETR1*, *FaETR2* y *FaERS1*) y cuya expresión es inducida por esta hormona de forma diferencial durante la maduración del fruto (Trainotti *et al.*, 2005), lo que podría indicar un posible papel del etileno en la maduración del fruto de fresa. Plantas transgénicas de fresa sobreexpresando el receptor de etileno *etr1-1* de *A. thaliana* mostraron una represión considerable de los niveles de los receptores de etileno *FaETR1*, *FaETR2* y *FaERS1*, lo que condujo a cambios en la sensibilidad al etileno (Merchante *et al.*, 2013). Adicionalmente, se observaron cambios en la expresión de algunos genes relacionados con las pectinas en el receptáculo. En los receptáculos transgénicos se encontró inducida la expresión de *FaPE1* mientras que la de *FaPLA* fue reprimida. También disminuyó la expresión de *FaPG2* pero no la de *FaPG1*, indicando que el etileno no tiene un efecto general en todos los genes asociados al proceso de maduración. Esto explicaría por qué no se encuentra un efecto del etileno sobre la firmeza de los frutos (Merchante *et al.*, 2013). El programa metabólico asociado con la maduración de los receptáculos de fresa está también regulado por etileno. El descenso en la percepción del etileno causó una disminución del contenido de compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, incluyendo el ácido cítrico, succínico y málico en el estadio blanco. Esto lleva acompañado un aumento del contenido de algunos aminoácidos (serina, fenilalanina y alanina) y una disminución de los principales azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en el estadio rojo de frutos transgénicos (Merchante *et al.*, 2013). Aunque la producción de volátiles no ha sido evaluada en estas líneas transgénicas, sí se ha observado un descenso en la expresión del gen *FaOMT*, lo que apoya un cambio en la producción de mesifuranona. Se ha descrito que variaciones naturales en el contenido de mesifuranona están

asociadas con la expresión del gen *FaOMT* (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). En general, los datos presentados en este trabajo indican que el etileno es necesario para el correcto desarrollo del fruto de fresa (Merchante *et al.*, 2013).

Respecto a la interacción entre etileno y MeJA, se ha descrito que tratamientos con MeJA estimula la biosíntesis de etileno en fresa incrementando los niveles de transcrito de ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa) y ACO (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa) (Concha *et al.*, 2013).

5.5. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son un grupo de hormonas vegetales esteroideas necesarios para el desarrollo normal de las plantas (Davies, 2004) cuyos niveles bioactivos incrementan dramáticamente al comienzo de la maduración de las uvas (Symons *et al.*, 2006). Tratamientos con BRs promovieron la maduración de la uva, mientras que la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de BRs retrasaron este proceso (Symons *et al.*, 2006). Estos resultados nos proporcionan claras evidencias de que cambios en los niveles endógenos de BRs tienen una fuerte influencia sobre los procesos de maduración en frutos no-climatéricos y plantea la cuestión de si los BRs pueden jugar un papel importante como hormona señal que desencadene los procesos de maduración en otros frutos no-climatéricos. En frutos climatéricos como el tomate, discos de pericarpio del mutante insensible a etileno, *Never ripe (Nr)*, fueron tratados con BRs provocando una acumulación significativa de carotenoides respecto a los controles (Liu *et al.*, 2014). Además, un gen mutante de *Arabidopsis bzr1-1D* dominante, *BZR1-1D (Brassinazole resistant 1)*, se sobreexpresó en tomate para evaluar el papel de BZR1 en el proceso de maduración de los frutos de tomate. Los frutos de las plantas de tomate transformadas mostraron un color verde oscuro durante el estadio verde maduro (MG), un aumento de la acumulación de carotenoides y el contenido de azúcares solubles y ácido ascórbico durante la maduración (Liu *et al.*, 2014). Estos resultados indican un uso potencial de BZR1 para la mejora de la calidad nutricional y del sabor del tomate mediante ingeniería genética.

El desarrollo del fruto de fresa está acompañado también por cambios en los niveles de BRs (Symons *et al.*, 2012). Los niveles de catasterona (CS) alcanzan un pico máximo en flores y van descendiendo progresivamente a lo largo de sucesivas etapas del desarrollo del fruto. De hecho, el contenido de CS desciende a niveles por debajo de los límites de detección durante los estadios blanco y rojo. El BR más bioactivo en fresa, el brasinólido (BL) (Wang *et al.*, 2001), no fue detectado en ninguna etapa del desarrollo del fruto; lo que sugiere que los BRs no juegan

un papel decisivo durante las etapas de desarrollo y maduración del fruto de fresa, aunque es posible que sí lo tenga en etapas más tempranas.

6. Control de la floración

La formación de flores en la planta de fresa es inducida a bajas temperaturas y con fotoperíodos cortos. Aunque todas las especies de *Fragaria* muestran una gran variedad de respuesta a la temperatura y a la longitud del día a la hora del desarrollo de yemas florales (Heide y Sønsteby, 2007), también las auxinas y citoquininas juegan un papel importante en este proceso (Hou y Huang, 2005; Eshghi y Tafazoli, 2007). Así, es probable que las auxinas se produzcan en las hojas más jóvenes y posteriormente se transporten a los meristemos de los brotes apicales a través de los tejidos vasculares. Esta teoría se ve apoyada por el aislamiento en fresa del gen *ABPI* que codifica una proteína de unión a auxinas (ABP1) (Lazarus y MacDonald, 1996). En cualquier caso, existen cultivares de día corto, de día largo y de fotoperíodo insensible (día neutro o “Everbearing”).

En oposición a las plantas de *F. vesca* de día corto y floración estacional, existen accesiones de floración perpetua (*F. vesca* f. *semperflorens*) que dan flores y frutos desde comienzos del verano hasta finales del otoño (Brown y Wareing, 1965). Se ha comprobado que tres accesiones de floración perpetua presentan respuestas medioambientales opuestas en comparación con las plantas de día corto. Dichas accesiones son plantas de día largo que florecen rápidamente bajo fotoperíodos largos y altas temperaturas, en contraposición a las plantas de día corto que reprimen la floración bajo tales condiciones (Sønsteby y Heide, 2008; Mouhu *et al.*, 2009). Estudios genéticos clásicos demostraron que la floración perpetua es causada por los alelos recesivos de un único gen represor llamado *seasonal flowering locus* (*SFL*; Brown y Wareing, 1965; Albani *et al.*, 2004). Los cultivares de floración perpetua (a menudo llamados remontantes o “everbearing”) están también representados en la fresa cultivada. Estos cultivares han sido considerados como cultivares de día neutro o plantas de día largo dependientes de la temperatura (Sønsteby y Heide, 2007; Weebadde *et al.*, 2008; Bradford *et al.*, 2010; Stewart y Folta, 2010).

Por otra parte, durante la búsqueda de genes diferencialmente expresados en frutos de fresa, se identificó un ADNc correspondiente al gen *FaGAST1* (ácido giberélico de transcripción estimulada) (de la Fuente *et al.*, 2006). Este gen está altamente expresado en frutos en estadio blanco, rojo maduro y en raíces, donde su expresión se relaciona con el proceso de elongación de las células del extremo apical. Líneas transgénicas de *Fragaria vesca* sobre-expresando el gen *FaGAST1* mostraron un retraso en el crecimiento de la planta, tamaño reducido de los

frutos, floración tardía y sensibilidad baja a giberelinas. Por ello, los genes *FaGAST* se han asociado con eventos como la división celular, la elongación celular y la floración (Wisemann y Turnbull, 1999).

Ya que el crecimiento de los meristemos a menudo se convierte en un factor determinante de la transición de la floración, el gen *AGAMOUS* (*AG*) (relacionado con el desarrollo del meristemo, con la formación de los estambres y la iniciación del carpelo) (Battey y Tooke, 2002), juega un papel importante en el proceso de floración. En el caso de la fresa, la expresión de un gen homólogo del *AG* (*FaAG1*) está limitada a los estambres, carpelos y a frutos en desarrollo, en consonancia con su papel regulador del desarrollo de los órganos florales (Rosin *et al.*, 2003). Por otra parte, la histona H4, implicada en el mantenimiento de la estructura de la cromatina en células eucariotas, incrementó su expresión en plantas de fresa bajo condiciones de inducción de la floración (Kurokura *et al.*, 2006).

Iwata *et al.* (2012) identificaron un gen homólogo a *TFL1* (*Terminal Flower 1*) en *F. vesca* (*FvTFL1*) como gen candidato para *SEASONAL FLOWERING LOCUS* (*SFL*). Demostraron que *FvTFL1* presenta una delección de 2 pb asociada con el fenotipo de floración perpetua en *F. vesca*, pero no aportaron pruebas funcionales para su validación. Posteriormente, Koskela *et al.* (2012) sí aportaron pruebas funcionales de *FvTFL1* como *SFL*. Así, sus resultados indicaron que *FvTFL1* es el componente clave en la ruta fotoperiódica perenne de *F. vesca* que confiere el requisito de día corto para la floración y el control cíclico entre las fases de reproducción vegetativa asexual y sexual.

Estudios recientes se han llevado a cabo sobre la regulación de los procesos de floración y estolonamiento en dos cultivares octoploides de fresa: CF1116, con genotipo de floración estacional, y Capitola, con genotipo de floración perpetua. Tanto las bases genéticas de la regulación de la floración perpetua como los rasgos de estolonamiento fueron investigados en una población F1 obtenida del cruce entre ambos genotipos (Gaston *et al.*, 2013). Los resultados mostraron que un solo locus principal de rasgo cuantitativo (QTL) llamado *FaPFRU* controla ambos rasgos (Gaston *et al.*, 2013). Este locus no es ortólogo a los loci que afectan a la floración perpetua y al estolonamiento en la especie silvestre de fresa *Fragaria vesca*, lo que sugiere diferencias en el control génico de la floración y el estolonamiento entre la especie diploide y la octoploide (Gaston *et al.*, 2013). Por otra parte, el QTL *FaPFRU* mostró efectos opuestos sobre la floración (efecto positivo) y el estolonamiento (efecto negativo), indicando que ambos rasgos comparten un control fisiológico común. Estos resultados sugieren que este locus juega un papel importante en la adaptación de las plantas de fresa mediante el control del equilibrio entre la reproducción sexual y asexual (Gaston *et al.*, 2013).

7. Expresión génica durante el desarrollo y la maduración del fruto de fresa

El proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa ha sido analizado mediante tres aproximaciones moleculares. En primer lugar, se compararon los productos de traducción *in vitro* de dos poblaciones de ARNm procedentes de receptáculo de fruto en estadio blanco y estadio rojo de maduración respectivamente. La separación de ambas poblaciones mediante electroforesis bidimensional mostró numerosas diferencias entre ambos. Así, se observó que el estadio intermedio de maduración (fruto blanco) está precedido por numerosos cambios a nivel molecular reflejados en variaciones en ciertos grupos de ARNm (Manning, 1993). Se han descrito tres modelos de evolución de los transcritos: un primer grupo de ARNm cuya concentración aumenta a lo largo de la maduración; un segundo grupo constituido por ciertas poblaciones de ARNm cuyos niveles disminuyen a lo largo del proceso; y un tercer grupo de ARNm cuyos componentes alcanzan su máxima concentración en el estadio intermedio para posteriormente declinar (Veluthambi y Poovaiah, 1984; Reddy y Poovaiah, 1990; Reddy *et al.*, 1990; Manning, 1994). Estos modelos de expresión podrían indicar que el proceso de maduración de la fresa incluye tanto la desaparición de polipéptidos existentes en los estadios de elongación del fruto, como la síntesis de nuevas proteínas. Mediante este sistema de traducción *in vitro* de ARNm, también se han identificado alrededor de 50 polipéptidos que presentan cambios importantes de concentración a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo del fruto (Manning, 1994). Además, se ha comprobado que varias enzimas específicas asociadas a membrana (Civello *et al.*, 1995), relacionadas con la producción de antocianinas (Given *et al.*, 1988a), y con el metabolismo de la sacarosa (Hubbard *et al.*, 1991) también aumentan su actividad durante el proceso de maduración de la fresa.

Otra aproximación molecular llevada a cabo recientemente fue a través de proteómica cuantitativa mediante el marcaje de péptidos por dimetilación con isótopos estables (Li *et al.*, 2013). Posteriormente, índices de calidad fisiológica, (como producción de volátiles, compuestos fenólicos, antocianinas totales, capacidad antioxidante, presencia de sólidos solubles y nivel de acidez titulable), fueron analizados en frutos de fresa en estadios blanco, intermedio y rojo. Entre las proteínas cuantificadas, se detectó un incremento a lo largo de la maduración de proteínas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides y antocianinas, biosíntesis de volátiles, metabolismo antioxidante, proteínas de respuesta a estrés y formación de alérgenos (Li *et al.*, 2013). Por otro lado, las proteínas que disminuyeron a lo largo de la maduración fueron aquellas responsables del metabolismo de la metionina, estado redox, metabolismo energético y síntesis de proteínas (Li *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos de este trabajo, no sólo muestran que la maduración del fruto de fresa es un sistema altamente complejo

que se puede estudiar a través de cambios en la expresión de proteínas, si no que además proporciona nuevos conocimientos sobre la regulación de las proteínas durante la maduración del fruto de fresa asentando las bases para estudios más específicos.

El proceso de maduración del fruto de fresa también ha sido ampliamente estudiado mediante la caracterización individual de genes que intervienen en el proceso. De este modo, se ha profundizado en la función que desarrollan genes que codifican enzimas degradadoras de la pared celular, genes relacionados con la biosíntesis de antocianinas, en la síntesis de compuestos volátiles y lignina y en otros procesos relacionados con la maduración de la fresa.

La reestructuración de la pared celular es una de las modificaciones más importantes que sufre el fruto durante su maduración y afecta, fundamentalmente, a su composición pectínica. En nuestro grupo, se han aislado y caracterizado varios genes que codifican pectato liasas (*p1A*, *p1B* and *p1C*) relacionadas con la pérdida de firmeza del fruto durante su proceso de maduración (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003). De hecho, su silenciamiento en frutos transgénicos se tradujo en un incremento de la firmeza de éstos y en un retraso en su proceso de maduración (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Paralelamente, también han sido aislados y caracterizados varios genes que codifican endoglucanasas (*Cel2*) (Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Palomer *et al.*, 2006), (*FaEG3*) (Trainotti *et al.*, 1999), (*Cell1*) (Harpster *et al.*, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001), una poligalacturonasa (*spG*) (Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Quesada *et al.*, 2009; García-Gago *et al.*, 2009) y una xilosidasa (*FaXyl1*) (Lee *et al.*, 2003; Minic *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2006), cuyas características de expresión los relaciona directamente con la maduración de la fresa. También se han identificado en fresa siete expansinas (*FaEXP1* a *FaEXP7*) (Harrison *et al.*, 2001) que participan en el reblandecimiento de la pared celular utilizando para ello como sustrato al xiloglucano presente en ella. De las siete descritas, sólo dos de ellas son específicas de fruto y aumentan su expresión a lo largo de la maduración (*FaEXP2* y *FaEXP5*) (Harrison *et al.*, 2001). De hecho, se ha encontrado una correlación entre la *FaEXP2* y la *FaEXP5* y los niveles de expresión y firmeza del fruto. Así, estudios en diferentes variedades de fresa indican que ambas expansinas muestran una mayor expresión en las variedades más blandas (Toyonaka y Gorella) que en otros cultivares más firmes (Selva, Camarosa, Holiday y Elsanta) (Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que las expansinas contribuyen a la maduración de la fruta y pueden ser responsables del grado de reblandecimiento en los distintos cultivares de fresa (Dotto *et al.*, 2006).

Asimismo, se han aislado y caracterizado cuatro genes que codifican pectin metil esterases en el fruto de fresa (*FaPE1* a *FaPE4*). Las PE catalizan la hidrólisis de los grupos metil éster de las

pectinas dando lugar a una desesterificación de la pared celular (Prasanna *et al.*, 2007). Su acción consiste en eliminar los grupos metoxilo y, por tanto, catalizan la desmetilación de las pectinas (Castillejo *et al.*, 2004; Prasanna *et al.*, 2007). Así, el grado de esterificación de la pectina es muy importante y puede influir en la actividad de otras enzimas asociadas a la pared como son la poligalacturonasa y las pectato liasas (Prasanna *et al.*, 2007). En fresa, se ha detectado la actividad de seis isoformas diferentes a partir de una muestra de extracto de pared, observándose como la expresión de la *FaPE1* es específica de fruto y está relacionada con la maduración de la fresa. En cambio, las otras isoformas son específicas de hojas (*FaPE2*) y otros tejidos vegetativos (*FaPE3* y *FaPE4*) (Castillejo *et al.*, 2004). En este sentido, la aparición de múltiples isoformas de PE en fresa indican que los diferentes genes codifican proteínas con diferentes funciones en la pared celular a lo largo del proceso de maduración (Castillejo *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la expresión de la *FaPE1* es inducida por auxinas, al contrario de otros genes de fresa como la PL (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Benítez-Burraco *et al.*, 2002), la PG (Quesada *et al.*, 2009) o EGases (Trainotti *et al.*, 1999). La regulación de la *FaPE1* por etileno durante la senescencia del fruto indica que su expresión puede ser un factor determinante en la cosecha de la fresa (Castillejo *et al.*, 2004). Recientemente, se han analizado plantas transgénicas de fresa de la variedad silvestre (*Fragaria vesca*) con expresión ectópica de la *FaPE1* procedente de *Fragaria × ananassa*. Los frutos obtenidos mostraron cambios en el grado y patrón de esterificación de sus pectinas y también un incremento de la expresión de SA y PR5 (Osorio *et al.*, 2008). Esto sugiere que la *FaPE1* podría participar en la metilación de derivados pectínicos oligogalacturónidos (OGA) envueltos en procesos de defensa. De hecho, los frutos transgénicos de fresa obtenidos fueron más resistentes a *Botrytis cinerea* que los frutos control procedentes de *F. vesca* (Osorio *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2011).

Más recientemente se ha aislado y caracterizado un gen que codifica para una ramnogalacturonato liasa (*FaRGlyase1*) (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) que se expresa al mismo tiempo que otras hidrolasas degradadoras de pectinas de la pared celular, lo que apoya la idea de que la degradación enzimática de las paredes celulares del parénquima cortical del fruto maduro influye en el reblandecimiento. La *FaRGlyase1* podría actuar sobre los RG-I de la pared celular primaria, relajando la estructura de la pared celular y permitiendo el acceso a sus sustratos a otras hidrolasas degradadoras de pectinas. Análisis por QTL mostraron que el gen *FaRGlyase1* está ligado a genes implicados en la firmeza del fruto. Todos estos resultados indican que el gen *FaRGlyase1* juega un papel muy relevante en el proceso de reblandecimiento del fruto de fresa durante la maduración reduciendo su firmeza (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013).

El proceso de maduración de la fresa va acompañado de un aumento del contenido hídrico del fruto. Cambios en la expresión de genes que codifican para acuaporinas durante los procesos de

crecimiento y maduración del fruto han sido asociados con un incremento del reblandecimiento del fruto. El reblandecimiento es consecuencia de una reducción en el turgor celular (Thomas *et al.*, 2006; Saladiè *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2008, 2009). La disminución de turgor puede ser atribuida a la pérdida de agua que sigue a la acumulación de solutos en el apoplasto durante la maduración (Wada *et al.*, 2008). En el fruto de fresa, la expresión génica de *FaPIP1* y *FaPIP2* fue mayor en frutos de un cultivar más firme (Camarossa) en comparación con la que se encuentra en un cultivar más blando (Toyonaka). Además, la co-expresión de los genes *FaPIP1;1* y *FaPIP2;1* resultó en un aumento de la permeabilidad al agua en los frutos (Alleva *et al.*, 2010; Yaneff *et al.*, 2014). Estos datos parecen indicar que ambos genes podrían ser responsables del control de la homeostasis del agua celular y de su acumulación, que puede estar relacionada con el mantenimiento de la turgencia de los frutos (Mut *et al.*, 2008; Alleva *et al.*, 2010). Recientemente se ha aislado y caracterizado el gen *FaNIP1;1*, que codifica para una acuaporina de tipo *nodulin 26-like* y que se expresa a lo largo del proceso de maduración. Sobreexpresando la proteína en levaduras como sistema heterólogo, se ha demostrado un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando la capacidad de esta proteína de transportar agua, además de solutos como glicerol, H₂O₂, y boro. También se demostró un incremento de la expresión del gen en condiciones de estrés hídrico en frutos, tanto realizados *in planta* como en frutos cortados; además también se indujo la expresión del gen *FaNIP1;1* en cultivos celulares de fresa, sometidos a presión osmótica con una solución de manitol (que provoca una condición de estrés hídrico en la célula). Usando una proteína de fusión a GFP se demostró que *FaNIP1;1* se localiza en la membrana plasmática. Todo ello parece demostrar que *FaNIP1;1* juega un papel importante en el incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, que permite la acumulación de agua en el receptáculo del fruto de fresa a lo largo del proceso de maduración (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015).

El fruto de fresa es rico en ácido *L*-ascórbico. La ruta que usa el *D*-galacturonato como sustrato inicial es funcional en el fruto maduro, pero la contribución de otras rutas a la biosíntesis de ácido *L*-ascórbico no ha sido estudiada. La transcripción de genes que codifican enzimas biosintéticas como la *D*-galacturonato reductasa (*FaGalUR*), la *myo*-inositol oxygenasa (*FaMIOX*), y la monodehidroascorbato reductasa (*FaMDHAR*) se correlacionan positivamente con un incremento de *L*-ascórbico durante la maduración del fruto (Cruz-Rus *et al.*, 2011). Por otra parte, existen evidencias de que la biosíntesis del ácido *L*-ascórbico en fresa podría realizarse a partir de ácido *D*-galacturónico, principal componente de las pectinas de la pared celular, y estaría catalizada, al menos parcialmente, por una *D*-galacturonato reductasa dependiente de NADPH (*GalUR*) (Agius *et al.*, 2003). Así, el máximo nivel de expresión del gen *FaGalUR* en el estadio rojo de maduración coincide con el aumento de solubilidad de las pectinas, debido a la acción de las pectato liasas, y con el máximo contenido de ácido ascórbico

que se observa en el fruto maduro, lo que apoya la ruta propuesta por Agius *et al.* (2003) para la biosíntesis del ácido *L*-ascórbico en el fruto de fresa. Recientemente, se ha llevado a cabo la sobreexpresión del gen de fresa *FaGalUR* en tomate (Amaya *et al.*, 2015). En general, la sobreexpresión de *FaGalUR* aumentó la capacidad antioxidante total en los tomates transgénicos y los resultados del análisis metabólico de dichos frutos sugieren un estricto control del contenido de ácido ascórbico, probablemente vinculado a una compleja regulación del estado redox celular y de ajustes metabólicos (Amaya *et al.*, 2015).

El proceso de maduración viene acompañado también de un aumento de las antocianinas presentes en el fruto. Esto supone un incremento de la expresión de genes involucrados en su síntesis como la PAL, CHS, F3H y DFR (Gong *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001). Concretamente, y teniendo en cuenta que la síntesis de antocianinas se produce dentro de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, se ha detectado una inducción general de los genes envueltos en ella (Anterola *et al.*, 2002). Igualmente, la síntesis de antocianinas durante la maduración parece estar regulada por la síntesis *de novo* de la enzima PAL (Hirner *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001) que es inhibida por la aplicación de auxinas (Given *et al.*, 1988a). La actividad de esta enzima parece presentar dos picos de expresión durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto. Así, un primer pico aparece en el fruto verde cinco días después de la antesis y cuando existe un nivel muy alto de fenoles solubles; y el segundo pico aparece 27 días después de la antesis, cuando el fruto está maduro (Cheng y Breen, 1991). Por otro lado, se ha aislado y caracterizado el gen *FaDFR* que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) potencialmente involucrada en el último paso de la ruta común a la biosíntesis de antocianinas y taninos condensados (Moyano *et al.*, 1998). Este gen es específico de fruto de fresa y, aunque su máximo de expresión se observa en los estadios de maduración del fruto, su expresión también se detecta en frutos en desarrollo (verdes). Esto sugiere una posible implicación de este gen no sólo en la producción de color en el fruto, sino también en la síntesis de los taninos condensados que se producen en los estadios iniciales de desarrollo (Moyano *et al.*, 1998). Recientemente, se ha demostrado que existen dos variantes del gen DFR y que su ratio de expresión condiciona la acumulación de pelagornidina en el fruto, sugiriendo diferente especificidad de sustrato (Mioisic *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que los genes *FaMYB1*, *FaMYB10*, *FaMADS9*, *FaSHPy* *FaGAMYB*, que codifican factores de transcripción de tipo MYB y MADS-box, podrían desempeñar funciones reguladoras de la síntesis de antocianinas y flavonoles durante la maduración del fruto de fresa (Aharoni *et al.*, 2001b; Lin-Wang *et al.*, 2010; Salvatierra *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2011; Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Vallarino *et al.*, 2015) (*Introducción general, apartado 4.2.2*).

Se ha estudiado también la función que desarrollan otros genes en diferentes procesos específicos de la maduración del fruto de fresa, como la producción de compuestos volátiles que participan destacadamente en la generación del aroma del fruto maduro (*FaOMT*, *FaNES1*, *SAAT*, *FaAAT2*, *FaPDC1*) (*Introducción general, apartado 4.2.1*). También, se han analizado los perfiles de expresión de genes involucrados en la síntesis de etileno (*FaACO1*), así como de genes que codifican receptores para esta fitohormona (*FaEtr2*) (*Introducción general, apartado 4.2.1*).

En relación al proceso de lignificación, la caracterización de los patrones de expresión del gen *Facad1* (que codifica una cinamil alcohol deshidrogenasa) y la inmunolocalización del polipéptido que codifica, sugiere su participación en el proceso de lignificación del tejido vascular de los tejidos vegetativos, del receptáculo y de los aquenios del fruto de fresa durante su maduración (Blanco-Portales *et al.*, 2002). En este mismo contexto, se ha identificado una proteína híbrida rica en prolina codificada por el gen *FaHyPRP* relacionada con el anclaje de polifenoles (ligninas y taninos condensados) a la membrana de las vacuolas y de las células parenquimáticas del receptáculo (Blanco-Portales *et al.*, 2004). La expresión de este gen es específica de fruto y sus niveles de transcrito se incrementan en la etapa de maduración. Estos datos de expresión junto con su localización en los mismos tipos celulares que la enzima *FaCAD1*, sugieren que la función de ambas proteínas podría ser complementaria (Blanco-Portales *et al.*, 2002). Recientemente, el análisis de los genes *CCR*, *CAD* y *POD* de *F. ananassa* reveló la importancia de *FaPOD27* para la formación de lignina durante el proceso de maduración y la firmeza en los frutos de fresa, así como un componente del mecanismo de defensa del fruto frente a ataques bacterianos (Yeh *et al.*, 2014).

Paralelamente, un nuevo gen de tipo *GAST*, *FaGAST2* (Moyano-Cañete *et al.*, 2013) ha sido identificado. Su expresión mostró un incremento a lo largo del desarrollo y la maduración del fruto de fresa, coincidiendo con las etapas de reducción de expansión de la fruta (V3-B y R-SM). *FaGAST2* comparte con *FaGAST1* (de la Fuente *et al.*, 2006) homología de secuencia a nivel aminoacídico y nucleotídico del 31% y 15% respectivamente, pero ambos genes contienen un péptido señal y un dominio altamente conservado de tipo GASA en el extremo carboxilo terminal. La expresión de *FaGAST2* está confinada principalmente al receptáculo del fruto de fresa y no está regulada por auxinas, GA_3 ni ABA, pero sí por etefón, un generador intracelular de etileno. Además, la expresión de *FaGAST2* incrementa en condiciones de estrés oxidativo provocadas por agua oxigenada y/o infección por *C. acutatum*, sugiriendo un papel directo de *FaGAST2* en la eliminación de especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento y maduración del fruto y la infección fúngica (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Por otro lado, la sobre-expresión de *FaGAST2* en diferentes líneas de plantas de fresa transgénicas analizadas

provocó el retraso en el crecimiento de las mismas y una reducción del tamaño de los frutos transgénicos. Análisis histológicos llevados a cabo en dichos frutos confirmaron que las células del parénquima de dichos frutos eran de menor tamaño, corroborando la idea de la existencia de una relación entre la expresión de *FaGAST2*, la elongación de las células del fruto de fresa y el tamaño del fruto (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Sin embargo, el silenciamiento transitorio de *FaGAST2* mediante ARN interferente provocó un aumento en la expresión de *FaGAST1* sin observar cambios en el tamaño de las células del fruto. Estos resultados apoyan la hipótesis de que ambos genes pueden actuar de manera sinérgica para determinar el tamaño celular del fruto durante el desarrollo y la maduración del mismo (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

En general, se ha observado que la mayoría de los genes implicados en el proceso de maduración del fruto de fresa se encuentran regulados negativamente por las auxinas sintetizadas en los aquenios. Este es el caso de los genes *FaDFR* (Moyano *et al.*, 1998), *Fapl* (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003), genes *Cell* y *FaEG3* que codifican endoglucanasas (Harpster *et al.*, 1997; Trainotti *et al.*, 1999), el gen *FaXyl1* (Martínez *et al.*, 2004), y los genes *FaQR*, *Fapmsr*, *Faufgt* (López *et al.*, 2006; Lunkenbein *et al.*, 2006a; Raab *et al.*, 2006;), *Fa4cl* (López-Ráez *et al.*, 2003), *FaHyPRP* (Blanco-Portales *et al.*, 2004), *FaAAT2* (Cumplido-Laso *et al.*, 2012), *FaRGLyase1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013), *FaMYB10* (Medina-Puche *et al.*, 2014) y *FaNIP1;1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015) entre otros.

8. Genes implicados en la mejora de fresa

La familia de las Rosaceas presenta una gran diversidad fenotípica ya que está compuesta por muchas especies diferentes. Dentro de sus miembros se incluyen árboles de gran interés, como el melocotón y la manzana, así como zarzas, rosas, almendras y fresas. En la actualidad, existe escasa información acerca del desarrollo de sistemas transgénicos eficientes para evaluar la función de genes entre las diferentes especies. A pesar de ello, recientemente se han identificado genes implicados en procesos importantes relacionados con la producción y la calidad de las frutas mediante transgénesis. No obstante, la evaluación de la función de genes transgénicos es bastante lenta aunque proporciona una herramienta muy valiosa para la selección de genes que puedan determinar una mejora del fruto de la fresa.

8.1. Mejora de la planta de fresa frente a plagas y enfermedades

8.1.1. Resistencia a agentes abióticos

En su hábitat natural, las plantas de fresa están expuestas a diferentes agentes abióticos como el déficit de agua, altas temperaturas, salinidad, metales pesados y daños mecánicos. Se estima que estas condiciones de estrés pueden reducir el rendimiento de los cultivos hasta un 50% (Vij y Tyagi, 2007). Por ello, se han realizado estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares acerca de la tolerancia de las plantas al estrés y aclarar así cuales son los mecanismos intrínsecos de éstas para poder minimizarlos.

Se sabe que las plantas anuales y perennes de invierno que crecen a bajas temperaturas desarrollan tolerancia frente a la congelación. Así, mediante la utilización de una genoteca de ADNc de plantas de fresa aclimatadas al frío (*Fragaria cold-regulated*, *Fcor*) se consiguieron identificar varios genes (*Fcor1*, 2 y 3) que presentaban expresión diferencial a bajas temperaturas (NDong *et al.*, 1997). Mientras que *Fcor1* y *Fcor2* se expresaron en todos los tejidos analizados, la expresión de *Fcor3* fue específica de hojas. También, se ha aislado una proteína quinasa calcio-dependiente (CDPK) que parece estar involucrada en la tolerancia al frío en fresa (Llop-Tous *et al.*, 2002). *FaCDPK1* se expresa en raíces, estolones, meristemos, flores, hojas y en frutos a partir del estadio blanco. Además, también se ha observado un incremento significativo de los niveles de transcrito del gen *FaCDPK1* después de 10 h de tratamiento en frío (4 °C), lo que sugiere para esta proteína un papel tanto a nivel de desarrollo de la fruta como en respuesta a bajas temperaturas. Por otra parte, también ha sido clonado en fresa el factor de transcripción CBF1 que participa en la aclimatación de *Arabidopsis thaliana* a bajas temperaturas (Owens *et al.*, 2002). No obstante, el análisis de los frutos obtenidos a partir de dos líneas transgénicas de fresa sobre-expresando el gen *FaCBF1*, no mostró cambios significativos en su tolerancia a la congelación (Owens *et al.*, 2002).

Para conferir resistencia al frío en plantas de fresa, también se han utilizado genes foráneos. Así, el gen de trigo *Wcor410a dehidrina ácida*, cuyo nivel de expresión se correlaciona con el grado de tolerancia a la congelación de diferentes genotipos de trigo (Houde *et al.*, 2004), se empleó para obtener líneas transgénicas de fresa con altos niveles de expresión de este gen. Las plantas transgénicas obtenidas presentaron un mayor grado de aclimatación al frío y de tolerancia a la congelación. La sobre-expresión con el promotor *rd29A*, inducible por estrés (deshidratación, estrés salino, bajas temperaturas) unido al gen de arroz *RdreB1B1*, codificante de un factor de transcripción de unión tipo DRE (elementos de respuesta a la deshidratación) también mostró una mejora significativa en la tolerancia al frío (Gu *et al.*, 2013). Análisis transcriptómicos de

estas plantas transgénicas sometidas a estrés de baja temperatura permitieron la identificación de un gran número de factores de transcripción y genes implicados en la biosíntesis de antocianinas regulados diferencialmente (Gu *et al.*, 2015). Otro sistema empleado para incrementar la resistencia de las plantas de fresa a las heladas es la transferencia de la proteína AFP codificada por genes anticongelantes de peces antárticos (AFP). De esta manera, se han obtenido plantas transgénicas de fresa aunque no hay información concluyente sobre su tolerancia al frío (Khammuang *et al.*, 2005). No obstante, a partir de fresa y otros cultivos, se han aislado e identificado un gran número de genes que son inducidos por el frío, aunque aún se conoce poco sobre su función en la resistencia al frío.

La glicina betaína se acumula en la planta de fresa durante su proceso de aclimatación al frío en diferentes cultivares. Un incremento de concentración de dos veces de glicina betaína en fresa incrementa su tolerancia al frío de -5,8 °C a -17 °C (Rajashekar *et al.*, 1999). Del mismo modo, la aplicación exógena de ácido abscísico, que desencadena la síntesis de betaína o glicina betaína, aumenta la supervivencia de las plantas en condiciones de congelación mejorando su crecimiento (Rajashekar *et al.*, 1999). Igualmente, en condiciones de estrés osmótico o de sequía también se produce una acumulación significativa de este aminoácido en muchas plantas lo que ha llevado a proponer que la acumulación de este soluto en plantas es un mecanismo de adaptación medio ambiental (Rajashekar *et al.*, 1999).

La osmotina es una proteína relacionada con la patogénesis que inicialmente fue identificada en cultivos celulares de tabaco en condiciones de estrés salino. Muchos estudios han demostrado que la expresión de este tipo de proteínas puede inducirse tanto en condiciones de estrés abiótico como por infecciones microbianas. En fresa, se ha clonado el gen *OLP2* (*osmotin like protein*) que se expresa en hojas, corona, raíces, frutos verdes y frutos rojos con diferente intensidad (Zhang y Shih, 2007). Este gen responde a diferentes estímulos abióticos (ácido abscísico, ácido salicílico y heridas mecánicas) lo que sugiere que podría ayudar a proteger a la planta frente a estreses ambientales e infecciones por patógenos. Esta teoría parece haber sido confirmada con los datos obtenidos a partir de plantas transgénicas de fresa portadoras del gen osmotina de tabaco, ya que su análisis mostró un incremento de su tolerancia al estrés salino (Husaini y Abdin, 2008). Del mismo modo, el gen de fresa de transferencia no específica de lípidos (*F \times altp*) también es inducido por el ácido abscísico, ácido salicílico y heridas mecánicas, aunque es reprimido por el estrés al frío (Yubero-Serrano *et al.*, 2003).

Las temperaturas elevadas constituyen otro de los estreses abióticos más frecuentes a los que se ven sometidas las plantas. Los organismos responden a ellas mediante la síntesis de un grupo específico de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP). En fresa, se ha aislado,

a partir de una genoteca substractiva de ADNc, el gen *HSP* que muestra una homología significativa de secuencia con la proteína HSPI citoplasmática de bajo peso molecular (Medina-Escobar *et al.*, 1998). No obstante, los datos de expresión del gen *HSP* obtenidos sugieren que esta clase de proteínas no sólo tienen un papel en la respuesta de la planta al estrés sino también en su desarrollo, incluyendo la maduración del fruto. Otro estudio realizado en plantas de fresa expuestas a estrés térmico gradual ha permitido observar un aumento de la actividad peroxidasa con respecto a las plantas control, lo que se ha asociado con los procesos de aclimatación de la planta al calor (Gülen y Eris, 2004). Esto parece indicar que la transcripción de algunos genes peroxidasa es dependiente de la temperatura.

Otro péptido importante en la protección de las células frente al daño oxidativo causado por el estrés salino y por la infección de patógenos es la metionina sulfóxido reductasa (PMSR). Recientemente, se ha aislado el gen *Fapmsr* a partir de frutos de fresa y se ha comprobado que su expresión es específica de receptáculo de frutos rojos maduros (López *et al.*, 2006). La proteína recombinante FaPMSR expresada en *E. coli* redujo el sulfóxido de metionina libre a metionina, protegiendo así a su hospedador frente al daño producido por la adición de H₂O₂. Por consiguiente, los resultados obtenidos coinciden con la hipótesis de que el programa de transcripción durante la maduración de la fresa induce estrés oxidativo (Aharoni *et al.*, 2002b).

Recientemente, ha sido identificada y caracterizada una putativa peroxidasa en fresa (FaPRX27) (Ring *et al.*, 2013). Las peroxidases catalizan la reducción de H₂O₂ al tomar electrones de varias moléculas donadoras. La clase III de las peroxidases de plantas oxidan moléculas donadoras de electrones tales como fenoles, precursores de ligninas o metabolitos secundarios. El genoma de *F. vesca* alberga 84 genes que codifican para putativas peroxidases hemo-dependientes implicadas en diversos procesos fisiológicos tales como lignificación, suberización, entrecruzamiento de proteínas de pared celular, catabolismo de auxinas, tolerancia salina, defensa frente al ataque por patógenos y al estrés oxidativo (Valério *et al.*, 2004; Lüthje *et al.*, 2011; Mathé *et al.*, 2010). Ensayos enzimáticos han confirmado el papel desempeñado por FaPRX27 en la biosíntesis de ligninas a partir de ácido felúrico, coniferil alcohol y ácido cafeico transformados en dihidrodímeros en presencia de peróxido de hidrógeno. Por otra parte, el análisis de QTL mostró que FaPRX27 está vinculado a una región implicada en la disminución color de la fruta. Esta aproximación experimental es funcionalmente relevante y confirma a FaPRX27 como una peroxidasa de lignina funcional que interviene en la polimerización de compuestos fenólicos solubles en planta. El producto del gen compite con las enzimas de la vía de flavonoides y antocianinas por los sustratos y por lo tanto determina la intensidad del color de la fruta roja (Ring *et al.*, 2013).

8.1.2. Resistencia a agentes bióticos

Como la mayoría de plantas cultivadas, la fresa es susceptible a muchas enfermedades y plagas que producen importantes pérdidas económicas debido al gasto que suponen los tratamientos fitosanitarios y la reducción de la producción de la cosecha. Además, la eliminación gradual del bromuro de metilo en muchos países desarrollados, aumenta las dificultades para obtener rendimientos aceptables en suelos no fumigados. Por ello, un objetivo muy importante en la investigación actual es la mejora de la resistencia natural de la planta de fresa mediante su manipulación genética.

La antracnosis es una de las principales enfermedades fúngicas de la fresa. Es causada por tres especies de *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*), que se caracterizan por dañar los órganos vegetativos de la planta y el fruto. Estudios realizados sobre la segregación de poblaciones de *Fragaria* × *ananassa* mostraron que la resistencia a la antracnosis puede ser tanto poligénica como mendeliana (Giménez y Ballington, 2002; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005). Independientemente de esto, se han podido seleccionar variedades resistentes de fresa mediante programas de cultivos (Smith *et al.*, 1996).

El loci monogénico dominante *Rfp1*, vinculado a marcadores SCAR (desarrollado a partir de los RAPD), está asociado a la resistencia a *Phytophthora fragariae* (Haymes *et al.*, 1997). Además, se ha analizado un amplio rango de genotipos de *F. × ananassa* con otro loci dominante *Rfp*. Paralelamente y, mediante el estudio genético de poblaciones segregantes, también se ha estudiado la variación genética asociada a la resistencia a *Phytophthora cactorum* (Shaw *et al.*, 2008). Para ello, ha sido de gran ayuda la caracterización molecular y bioquímica del péptido fitotóxico extracelular PcF producido por *Phytophthora cactorum*. Esto ha ayudado a conocer las características del proceso de patogenicidad y está permitiendo asentar las bases para realizar bioensayos e identificar genotipos resistentes de fresa (Orsomando *et al.*, 2001).

Otro patógeno que infecta a la fresa es *Verticillium dahliae*. Este organismo es transmitido desde el suelo a la planta y ataca a los tejidos vasculares causando graves pérdidas. Estudios de la resistencia frente a este patógeno en diferentes variedades de fresa indican que ésta se basa en factores poligénicos con efecto aditivo, aunque no se ha descartado la herencia mendeliana (Zebrowska *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios similares realizados en varias variedades de fresa y sus correspondientes poblaciones F1, indicaron que tanto factores monogénicos como poligénicos están involucrados en la resistencia a la marchitez causada por *Fusarium* (Mori *et al.*, 2005). En cualquier caso, hasta ahora no se han desarrollado marcadores moleculares asociados a locus específicos implicados en la resistencia de la planta a estos hongos patógenos.

Actualmente, se están desarrollando tecnologías cada vez más efectivas de secuenciación de ADN que nos permitirán el análisis de los genomas de plantas y microorganismos, facilitando el desarrollo de nuevos marcadores que permitirán el descubrimiento y mapeo fino de nuevos genes y compuestos vinculados al fenómeno de la resistencia. En este sentido, los análisis de secuenciación de genomas, tanto del género *Fragaria* como de otras especies de la familia Rosaceae, y su comparación, ha permitido identificar genes *RGA* (*Resistance Gene Analogs*) y microsatélites polimórficos relacionados con el fenómeno de la resistencia (Cipriani y Testolin, 2004; Folta *et al.*, 2005; Lewers *et al.*, 2005; Gil-Ariza *et al.*, 2006; Keniry *et al.*, 2006; Monfort *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Además, mediante el empleo de cebadores degenerados, se han amplificado y caracterizado varios tipos de genes *RGA* en tres especies diferentes de *Fragaria* (Martínez-Zamora *et al.*, 2004).

Otra variante poco estudiada en el género *Fragaria* es la resistencia contra enfermedades bacterianas y plagas de artrópodos. No obstante, se han identificado factores de resistencia contra *Xanthomonas fragariae* en *Fragaria virginiana*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria* × *ananassa* y genotipos octoploides de *Fragaria* (Maas *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2006). Por otra parte, Barritt y Shanks (1980, 1981) investigaron poblaciones segregantes de *Fragaria chiloensis* × *Fragaria* × *ananassa* para identificar genes relacionados con la resistencia a pulgones y ácaros. Así, mediante el estudio de plantas de fresa modificadas genéticamente, se han obtenido resultados importantes frente a estas infecciones. Sin embargo, la aplicación de estos resultados está limitada por la falta de una normativa que regule el uso de cultivos transgénicos en Europa.

Paralelamente, también se está llevando a cabo el análisis de algunos péptidos y productos naturales con propiedades antibióticas aislados a partir de la planta de fresa. Recientemente, se ha evaluado la actividad antifúngica de compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por la planta de fresa frente a *C. acutatum*, lo que abre nuevas perspectivas en el control biológico de patógenos. Así, se ha observado una inhibición del crecimiento del micelio y de la germinación de las esporas de este hongo debido a los COV producidos por una lipoxigenasa a través de la degradación de ácidos grasos de 18 C (Arroyo *et al.*, 2007). Además, se ha aislado de hojas de fresa una molécula pequeña de 316 Da con actividad antibiótica denominada Fragarina que parece participar en respuesta a procesos de estrés (Filippone *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha mostrado un incremento de expresión del gen *Cyfl* en tejidos vegetativos de fresa, excepto en receptáculo, indicando que la proteína fitocistatina que codifica este gen podría resultar activa frente a varias proteinasas de cisteína de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, favoreciendo así la resistencia de la planta frente a estos patógenos (Martínez *et al.*, 2005).

El moho gris, enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, es muy común en todas las regiones productoras de fresa del mundo y una de las más destructivas. La infección primaria aparece en flores pero el desarrollo de los síntomas típicos se produce después de que la fruta se ha desarrollado y haya comenzado a madurar. Los pétalos y los estambres son los órganos florales que se infectan principalmente mientras que el receptáculo se infecta normalmente a partir del hongo que crece por el filamento, aunque la infección a través de los pétalos también es posible. Actualmente no hay variedades de *Fragaria* × *ananassa* resistentes a *B.cinerea*. Sí se han observado diferencias de susceptibilidad, pero probablemente se pueden atribuir a las características morfológicas de la planta. Powell *et al.* (2000) utilizaron plantas de tomate transgénicas que expresan la proteína inhibidora de la poligalacturonasa de pera (pPGIP) para demostrar que este inhibidor de endopoligalacturonasas patogénicas de origen fúngico (endo-PG) frena la expansión de las lesiones producidas por *Botrytis cinerea*. Igualmente, se han obtenido resultados positivos en plantas de fresa del cultivar “Pegasus” transformadas con el gen PGIP (de pera) frente a la enfermedad causada por *B.cinerea* tras rociar cada flor con una suspensión de conidios del hongo (1×10^4 / ml) (Schaart *et al.*, 2005). También se ha demostrado que la sobre-expresión ectópica del gen *FaPEI* confiere resistencia frente al ataque de este hongo patógeno, ya que aumenta la producción de oligogalacturonoides desmetilados, los cuales refuerzan el sistema de defensa de la planta (Osorio *et al.*, 2011).

Otros estudios realizados con plantas transgénicas de fresa han mostrado que altos niveles de quitinasa reducen los daños causados por el hongo oidio en la planta (Asao *et al.*, 1997; Asao *et al.*, 2003). En este sentido, Chalavi *et al.* (2003) aislaron un gen de quitinasa (*pcht28*) de *Solanum chilense* que, tras ser transferido a plantas de fresa de la variedad “Joliette”, incrementó significativamente la resistencia de las plantas transgénicas obtenidas frente a *Verticillium dahliae*. Paralelamente, Ricardo *et al.* (2006) obtuvieron líneas transgénicas de fresas expresando independientemente tres genes de defensa: *ch5B* [que codifica una proteína quitinasa de frijol (*Phaseolus vulgaris*)], *gln2* [que codifica una proteína glucanasa de tabaco (*Nicotiana tabacum*)], y *ap24* (que codifica la proteína taumatina de tabaco). Los principales resultados obtenidos en este estudio indicaron que la expresión del gen *ch5B* en frutos de fresa transgénicos incrementó la resistencia de éstos al moho gris, aunque no tuvo ningún efecto significativo en su resistencia a la antracnosis (Ricardo *et al.*, 2006).

8.2. Mejora de la floración y fructificación de la planta de fresa

El control de la floración es importante en la producción de fruto en *F. ananassa*, e implica diversos mecanismos moleculares que resultan en distintas respuestas de floración y ciclos de

crecimiento en función del fotoperíodo, la calidad de la luz y la temperatura (Rantanen *et al.*, 2014; Rantanen *et al.*, 2015). Se ha descrito un gen de tipo MADS-box, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS 1* (*FaSOC1*) como promotor de la floración en fresa (Lei *et al.*, 2013) cuya sobre-expresión en *Arabidopsis* conduce a un incremento de la expresión de los genes de floración *LEAFY* (*LFY*) y *APETALA 1* (*API*) (Lei *et al.*, 2013). En *F. vesca*, la sobre-expresión de *FvSOC1* reprime el inicio de la floración bajo días cortos, mientras que su silenciamiento causa floración continua tanto en días cortos como en días largos, similar a los mutantes en el represor floral *Fv terminal flower 1* (*Fv TFL1*) (Mouhu *et al.*, 2013). El análisis molecular de estas plantas transgénicas reveló que *FvSOC1* activa *FvTFL1* en el ápice del brote, conduciendo a la represión de la floración (Mouhu *et al.*, 2013). A su vez, *FvSOC1* está regulado por el fotoperíodo y por *Fv flowering locus T1* (*FvFLT1*), sugiriendo que *FvSOC1* desempeña un papel central en el control fotoperiódico de tanto el crecimiento vegetativo como generativo en fresa (Mouhu *et al.*, 2013). En *F. ananassa*, *FaTFL1* es un represor floral clave, así como su homólogo en *F. vesca*, habiéndose descrito una correlación negativa entre la floración (desarrollo de la flor y expresión de *FaAPI*) y la expresión de *FaTFL1* (Nakano *et al.*, 2015).

Mientras que la ruta de inhibición de la floración ha sido ampliamente estudiada en *F. vesca*, los factores implicados en su promoción permanecen inciertos. Por el momento, en *F. ananassa* se ha identificado *FaFT3* (FLOWERING LOCUS T) como un putativo promotor floral, cuya inducción bajo día corto o bajas temperaturas se considera un paso clave en la inducción floral (Nakano *et al.*, 2015).

La modificación de la época de floración y fructificación de un cultivo puede mejorar su producción de manera cuantitativa y cualitativa. Debido a ello, actualmente se está estudiando el efecto que tiene sobre el desarrollo de las plantas y su fructificación la modificación de su regulación hormonal para conseguir una mejora del cultivo de la fresa, de su capacidad de adaptación y de su resistencia a las enfermedades. Estas modificaciones pueden lograrse fácilmente mediante la introducción de genes capaces de alterar la regulación endógena del crecimiento vegetal (PGRs). Por otro lado, las auxinas han sido descritas como la principal molécula señal que coordina el crecimiento y desarrollo de los frutos de fresa. Recientemente, ha sido demostrado que dos genes *YUCCA* están implicados en la floración y desarrollo de la fresa. Concretamente, la sobre-expresión de *FvYUC6* produjo fenotipos típicos de plantas con alto contenido en auxinas, retraso en la floración y esterilidad masculina completa en *F. vesca* (Liu *et al.*, 2014). Además, el silenciamiento de *FvYUC6* mediante ARN interferente inhibió significativamente el crecimiento vegetativo, el desarrollo floral y los frutos se vieron ampliamente afectados, así como fue detectada una clara correlación entre el silenciamiento de

FvYUC6 y la expresión de un grupo de genes de respuesta a auxinas y los niveles de ácido indol-3-acético libre en dichas plantas transgénicas (Liu *et al.*, 2014).

Otra herramienta empleada para la manipulación endógena de las fitohormonas es la transformación de plantas de fresa con oncogenes procedentes de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*. Un ejemplo de esta metodología son los genes *rol*, que se han utilizado en la mejora de ciertas características agronómicas e incluso para la obtención de plantas con una morfogénesis alterada. Estos genes tienen una gran importancia en floricultura (Zuker *et al.*, 2001; Casanova *et al.*, 2005) y, concretamente, el gen *rol C* ha sido especialmente estudiado en frutos (Welander y Zhu, 2006). Bajo el control del promotor constitutivo CaMV-35S, el gen *rol C* ha provocado importantes alteraciones fenotípicas en la mayoría de las plantas estudiadas (Schmülling *et al.*, 1988; Nilsson *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 2006) y, en algunos casos, modificaciones importantes en la productividad de la planta y en la arquitectura de la flor (Winefield *et al.*, 1999; Mitiouchkina y Dolgov, 2000). En fresa, la expresión del gen *rolC* ha conducido a una mejora del fenotipo de la planta y, como consecuencia, también de su calidad, de su capacidad de adaptación y producción. Su función en fresa se ha estudiado en plantas transgénicas de la variedad “Calypso” (Mazzara *et al.*, 1998), comprobándose la existencia de alteraciones en el desarrollo *in vitro* de raíces frente a las plantas control. Además, las líneas con mayor nivel de expresión del gen *rol C* presentaron hojas de menor dimensión y una disminución del tamaño de la planta (Mezzetti *et al.*, 2004b). Por otra parte, los ensayos agronómicos mostraron que la sobreexpresión del gen *rol C* en fresa modificó características de interés económico como son la adaptabilidad de la planta, la productividad y la tolerancia al tipo de suelo, así como la calidad de la fruta (Landi y Mezzetti, 2006).

Actualmente, la mejora de la calidad de los cultivos sigue protagonizando un interés creciente debido a sus implicaciones sobre la salud humana, los beneficios económicos y la calidad de los alimentos. En fresa, la calidad del fruto se cuantifica en función de la concentración de azúcares solubles, varios ácidos orgánicos y el contenido de dos vitaminas (ácido ascórbico y ácido fólico). La co-inoculación de fresa con una mezcla de hongos micorrícicos arbusculares (AMF) y dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) bajo condiciones reducidas de productos químicos, resultó en un incremento de la floración y la producción de fruta, frutos de mayor tamaño y concentraciones superiores de azúcares, ácido fólico y ácido ascórbico en comparación con frutos de plantas no inoculadas (Bona *et al.*, 2015). Estos resultados proporcionan evidencias de que los microorganismos rizosféricos afectan positivamente sobre la calidad del fruto de fresa y muestra, incluso en condiciones de reducida fertilización química y por lo tanto puede ser una estrategia aprovechada para la agricultura sostenible.

8.3. Mejora de la calidad del fruto de fresa mediante la modificación de sus propiedades organolépticas

Los principales programas de biotecnología y reproducción de bayas tienen como prioridad la mejora de la calidad de la fruta. Para estos frutos tanto el sabor (resultado de la combinación de dulzura, acidez y aroma), como la firmeza son de gran importancia económica. Todos estos aspectos son controlados por procesos asociados al desarrollo y a la maduración de la fruta, lo que implica cambios específicos en la expresión génica y metabolismo celular (Manning, 1994). En frutos climatéricos, todos estos eventos son coordinados por el etileno sintetizado en las etapas tempranas de desarrollo del fruto, mientras que en frutos no climatéricos, aunque estos sufren los mismos cambios fisiológicos y bioquímicos, ninguno de los procesos responden a etileno.

8.3.1. Manipulación del proceso de reblandecimiento

La maduración de muchos frutos va acompañada de un reblandecimiento del tejido que termina con el deterioro irreversible de éstos. Este deterioro se debe fundamentalmente a la despolimerización y solubilización de la pared celular por la acción de numerosas proteínas, fundamentalmente hidrolasas de pared. Uno de los grupos de enzimas que intervienen en este proceso son las expansinas, que participan en la extensión de la pared celular. Así, se ha propuesto que estas proteínas *in vivo* interrumpen puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa dando como resultado una relajación de la pared celular que permite el movimiento de los polímeros durante el crecimiento (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Civello *et al.*, 1999; Brummell y Harpster, 2001). Su función, por tanto, explica la expresión de estos genes en tejidos vegetales como hipocotilos (McQueen-Mason *et al.*, 1992), coleóptilos (Cosgrove *et al.*, 1993), entrenudos (Cho y Kende., 1997), hojas (Keller y Cosgrove, 1995), raíces (Wu *et al.*, 1996), y frutas (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999; Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Hiwasa *et al.*, 2003), ya que todos ellos presentan una pared celular en crecimiento. Por otra parte, el estudio de frutos transgénicos de tomate donde se reprime y sobre-expresa el gen *LeExp1*, mostró un incremento de su firmeza y de su reblandecimiento respectivamente. Esto apoya la idea de que estas proteínas participan activamente en el proceso de degradación de la pared celular del fruto (Brummell *et al.*, 1999; Brummell y Harpster., 2001).

En tomate (*Solanum lycopersicum*), se ha observado la expresión de varias expansinas que se han relacionado con la hidrólisis de polímeros de la pared celular y, por lo tanto, con el reblandecimiento del fruto (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Civello *et al.*, 1999; Brummell

and Harpster, 2001; Li *et al.*, 2003). Igualmente, y a pesar de ser un fruto no climatérico, en fresa se han identificado varias expansinas cuya expresión varía a lo largo de la maduración y, una de las cuales (*FaExp2*) tiene una elevada homología de secuencia con una expansina expresada en el desarrollo temprano del tomate (Civello *et al.*, 1999). Aunque generalmente los genes expresados durante la maduración en fresa son regulados negativamente por auxinas, la expresión del gen *FaExp2* es independiente de estas hormonas. En general, todos los resultados descritos anteriormente sugieren que las expansinas participan en el proceso de maduración de los frutos y que, en frutos no climatéricos como la fresa, existen otros factores distintos a las auxinas que puede coordinar el inicio del proceso de maduración (Civello *et al.*, 1999).

El reblandecimiento del fruto también se está estudiando mediante el silenciamiento de la expresión de genes involucrados en la degradación de la pared celular (Mathews *et al.*, 1995; Woolley *et al.*, 2001; Jimenez-Bermúdez *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2006; Sesmero *et al.*, 2007; Posé *et al.*, 2013). De este modo, dos EGases, también llamadas celulasas, han sido aisladas y estudiadas en fresa (*Facell* y *Facel2*), estando implicados ambos genes en la maduración del fruto (Harpster *et al.*, 1997; Manning, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001; Spolaore *et al.*, 2003; Palomer *et al.*, 2006). La expresión del ARNm de *Facell* muestra un aumento gradual durante la maduración y un pico de expresión con la aparición del color rojo en los frutos maduros (Harpster *et al.*, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999). Por el contrario, la expresión de *Facel2* se ha observado en frutos verdes y en tejidos verdes vegetativos (Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999), por lo que este gen podría estar implicado en las modificaciones iniciales de la pared celular para facilitar tanto el crecimiento celular como la expansión (Woolley *et al.*, 2001). Además, existen diferencias en las estructuras secundaria y terciaria de ambas proteínas EGases sugiriendo que podría haber una especificidad de sustrato diferente (Llop-Tous *et al.*, 1999). De hecho, un dominio celulosa dentro de la estructura de *Facel2* podría indicar que esta EGasa puede ser especialmente activa frente a los xiloglucanos que cubren las microfibrillas de celulosa presente en la pared celular (Trainotti *et al.*, 1999). Por lo tanto, se ha propuesto que *Facel2* podría hidrolizar la red de xiloglucanos de la pared celular haciéndola más susceptible a la actividad hidrolítica de la *Facell* (Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001). Para determinar el verdadero papel de ambos genes en el reblandecimiento del fruto de fresa durante la maduración, se han realizado estudios con el antisentido del gen *Facell* (Woolley *et al.*, 2001) en combinación con *Facel2* (Palomer *et al.*, 2006). Los frutos transgénicos obtenidos mostraron una reducción parcial de la actividad EGasa y cambios en la firmeza de la fruta (Woolley *et al.*, 2001; Palomer *et al.*, 2006). Así, se observó como la regulación de *Facel2* podría compensar la baja expresión de *Facell*, sugiriendo además que ambos genes no son los únicos responsables de la despolimerización de los xiloglucanos durante la maduración de la fresa (Palomer *et al.*, 2006). No obstante, debido a

la especificidad de expresión del gen *Facell* en fruto, su promotor es un buen candidato para ser utilizado como herramienta biotecnológica.

Por otra parte, también se han aislado y caracterizado en fresa varias poligalacturonasas (PG1, PG2 y PG3) (*Introducción general, apartado 7*) (Nogata *et al.*, 1993; Salentijn *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2009) y, mediante análisis transcriptómicos en varios cultivares de fresa con diferentes firmezas, se ha comprobado su importancia en el proceso de maduración (Salentijn *et al.*, 2003). Recientemente, para aclarar la función de los genes *PGs* en el proceso de reblandecimiento de la fresa, se han generado plantas transgénicas con la expresión del gen *PGI* silenciada (Quesada *et al.*, 2009; Posé *et al.*, 2013). La mitad de las líneas transgénicas obtenidas mostraron frutos significativamente más firmes y una disminución de su reblandecimiento durante la postcosecha frente a los frutos control (Quesada *et al.*, 2009). En este sentido, los análisis indicaron que el silenciamiento del gen *FaPGI* se tradujo en una reducción de la solubilidad y despolimerización de las pectinas de la pared celular que condujo a una mayor integridad del tejido y una mayor firmeza de la fruta (García-Gago *et al.*, 2009). Más recientemente, en líneas con una reducción de los niveles de expresión del gen *FaPGI* superior al 90%, se ha demostrado que este incremento de la firmeza es predominantemente debido a una disminución de la solubilización y despolimerización de las pectinas, que se correlaciona más estrechamente con las uniones de las paredes celulares. Este limitado desensamblaje en las líneas transgénicas indica que estas fracciones de pectinas podrían desempeñar un papel clave en el mantenimiento de la integridad del tejido, lo que resulta en una fruta madura más firme (Posé *et al.*, 2013).

Paralelamente, también se han realizado en fresa estudios de expresión de varios genes que codifican pectato liasas (PL) (*Introducción general, apartado 7*), observándose un incremento de su expresión durante el proceso de maduración del fruto (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Benítez-Burraco *et al.*, 2002.). Este comportamiento junto con su localización, determinada mediante estudios de inmunolocalización, parece indicar que los genes *PGs* tendrían una función importante en el proceso de despolimerización de la pared celular (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Este dato fue confirmado mediante el análisis de los frutos transgénicos obtenidos a partir de 33 líneas transgénicas independientes con la expresión del gen *plC* silenciada. Así, los frutos transgénicos analizados mostraron un incremento significativo de su firmeza y una disminución de su reblandecimiento durante la postcosecha comparados con los frutos control sin mostrar diferencias en su color, tamaño, forma y peso (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Recientemente, se han analizado de forma independiente tres líneas transgénicas con una reducción superior al 90% en el nivel de transcrito correspondiente a pectato liasas (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). El análisis de estos frutos transgénicos mostraron diferencias

cuantitativas y cualitativas de los polímeros de pectina de la pared celular del fruto que se tradujo en un incremento de su grado de firmeza (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). Estos resultados indican que los genes *pl* juegan un papel muy importante en la degradación de la pared primaria y lámina media durante la maduración del fruto de fresa lo que los hace muy atractivos como herramientas biotecnológicas para retrasar y/o regular el reblandecimiento del fruto durante y tras su cosecha.

El silenciamiento transitorio en fresa de la expresión del gen *FaRGlyase1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) mantuvo íntegra la estructura de la lámina media de las células parenquimáticas de los frutos maduros transgénicos frente a los frutos control. No obstante, la estructura de la pared celular, el área de contacto entre células y el espacio intercelular permanecieron inalterados en los frutos silenciados, lo que indica que el gen *FaRGlyase1* podría jugar un papel crítico en el reblandecimiento del fruto a través de la degradación de la lámina media de las paredes celulares en el fruto maduro (Introducción general, apartado 7).

Otras enzimas implicadas también en la maduración del fruto de fresa son las pectín esterasas (Introducción general, apartado 7). En fresa, se ha aislado la *FaPE1* que muestra un incremento de expresión durante el proceso de maduración paralelo al de los genes PE, PL y PGs. De hecho, se ha propuesto que las modificaciones de la pared celular relacionadas con su reblandecimiento dependen de la actividad PG y PL, aunque la acción de la PE sería un requisito previo para que dichas enzimas hidrolíticas accedieran a la pectina de la pared (Prasanna *et al.*, 2007).

8.3.2. Mejora del sabor

El contenido y tipo de carbohidratos presentes en el fruto de fresa juega un papel importante en la determinación de su sabor y calidad. Así, en frutos maduros, los azúcares predominantes son las hexosas, glucosa y fructosa lo que influye en el potencial osmótico de las células y da lugar a un ajuste de la importación del agua y del crecimiento del fruto. En otras muchas especies frutales, la invertasa (β -fructofuranosidasa) es responsable de catalizar el desglose de la sacarosa. Concretamente, una invertasa localizada en pared celular es la encargada de regular la descarga de sacarosa al floema, mientras que una invertasa localizada en vacuola se encarga de regular el almacenamiento de sacarosa y hexosas (Xie *et al.*, 2007). En dos cultivares de fresa diferentes (Sinfónica y Senga Sengana) se introdujeron los genes correspondientes a la invertasa vacuolar y de pared celular de patata. El análisis posterior de las plantas transgénicas obtenidas mostró modificaciones en el crecimiento, en la composición de azúcares, en el sabor y en la calidad del fruto (Graham *et al.*, 1997b).

Posteriormente, se obtuvieron plantas transgénicas con la expresión de la pirofosforilasa ADP-glucosa (*AGPasa*) silenciada para evaluar los efectos de este gen sobre el contenido de carbohidratos en el fruto en desarrollo (Park *et al.*, 2006). Los resultados mostraron una reducción drástica de los niveles de ARNm correspondientes al gen *AGPasa* en frutos rojos, un incremento (16-37%) del contenido total de azúcares solubles y una disminución (27-47%) del contenido de almidón en la fruta madura. Estos resultados sugieren que el gen *AGPasa* podría ser empleado como herramienta biotecnológica para mejorar el contenido de azúcares solubles y disminuir el contenido de almidón en frutos de fresa, sobre todo teniendo en cuenta que no modifica ninguna otra característica organoléptica importante del fruto (Park *et al.*, 2006).

En los últimos años, el interés por mejorar el sabor de las variedades de fresa comercial ha ido incrementando. Muchos son los esfuerzos dirigidos a este objetivo a través del empleo de estrategias basadas en la genómica para la identificación de genes que controlan el sabor del fruto y posteriormente diseñar marcadores moleculares duraderos para seguir estos genes en las poblaciones reproductoras. Uno de estos marcadores es la γ -decalactona, un compuesto volátil que confiere una nota de sabor de melocotón a las frutas. Asociado a la presencia de este compuesto volátil se ha identificado a una desaturasa de ácidos grasos omega-6, *FaFAD1*, ya conocida por participar en la producción de lactona en hongos. Este gen, que induce su expresión a lo largo de la maduración del fruto de fresa, fue detectado en ciertas cosechas y se correlacionó con la presencia de γ -decalactona. De hecho, el gen *FaFAD1* está presente en los genotipos donde se ha detectado γ -decalactona y está ausente invariablemente en los genotipos no productores de tal compuesto (Chambers *et al.*, 2014).

8.3.3. Mejora del color

La fresa es un fruto que presenta una biosíntesis de flavonoides de tipo bifásica. Mientras que, en el receptáculo inmaduro los niveles de proantocianidinas se acumulan, hecho que se asocia con la disuasión de herbívoros y la defensa del fruto frente a patógenos, en los receptáculos maduros las antocianinas que aportan el color rojo característico se producen, entre otras cosas, para atraer a los herbívoros y favorecer la dispersión de las semillas. Recientemente, se han llevado a cabo experimentos de down-regulación de una de las ramas de la ruta de biosíntesis de proantocianidinas (Fischer *et al.*, 2014). Como resultado, la proporción de unidades monoméricas de epicatequina contenidas en las cadenas de polímeros de proantocianidinas se redujo, pero este no fue el caso para las unidades iniciadoras de epicatequina. También se observó un acortamiento en la longitud de las cadenas de proantocianidinas. No obstante, en frutos inmaduros de las líneas silenciadas mediante ARNi, así como en los estigmas de las

flores, otro tejido formador de epicatenina, se detectaron actividades enzimáticas dirigidas a la producción de color, por lo que el silenciamiento de la antocianidina reductasa (ANR) indujo una redirección de la vía de las proantocianidinas que conduce a la biosíntesis de antocianinas a través de glucosilaciones enzimáticas como ruta alternativa (Fischer *et al.*, 2014). Esta redirección también fue observada en la biosíntesis de flavonol, que es paralela a la mayor viabilidad del polen en las líneas silenciadas (Fischer *et al.*, 2014). De este modo, las líneas transgénicas con el gen ANR silenciado mediante ARNi proporcionan una herramienta versátil para el estudio de las funciones biológicas de las proantocianidinas.

9. Alérgenos de la fresa

Al igual que otras frutas, las fresas contienen proteínas que producen reacciones alérgicas. En fresa, la familia de proteínas Fra a1 presenta homología con el alérgeno Bet v1 de abedul, el cual incluye varios péptidos de unión a la IgE (Karlsson *et al.*, 2004; Musidlowska-Persson *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010). Se han realizado estudios de proteómica en fresa donde se compara variedades de fruto blanco con variedades de fruto rojo. Los resultados obtenidos indican que las proteínas Fra a1 están asociadas con un contenido bajo de alérgenos y con una biosíntesis reducida de antocianinas en genotipos blancos. El silenciamiento transitorio mediante ARN interferente de *Fra a 1E* en frutos de fresa confirmó que Fra a 1E está implicado en la síntesis de pigmentos en el fruto (Hjernø *et al.*, 2006; Alm *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010; Seutter von Loetzen *et al.*, 2012). Recientemente, Casañal *et al.* (2013) han conseguido cristalizar Fra a 1E y Fra a 3, proponiendo que tales proteínas podrían ser monoméricas en solución, lo cual podría ser un paso importante hacia el conocimiento de sus mecanismos de acción, no sólo en el control del metabolismo secundario en plantas, sino también en el origen de sus propiedades inmunogénicas (Casañal *et al.*, 2013). También, se ha propuesto que las proteínas PR-10 pueden controlar la biosíntesis de los flavonoides mediante la unión a intermediarios metabólicos. Así, estas proteínas podrían actuar como transportadores o “chaperonas químicas” haciendo posible el procesamiento enzimático. Las proteínas Fra a podrían formar parte de complejos multiproteicos que incluirían PAL, CHS y C4H. Fra a también podría estar implicado en el transporte de flavonoides del retículo endoplásmico a otras membranas celulares como el tonoplasto o la membrana plasmática. Otra posibilidad es que Fra a pudiera jugar un papel regulador en la señalización intracelular debido a su capacidad de unión específica a flavonoides (Casañal *et al.*, 2013).

Otros alérgenos de fresa son las profilinas y las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), que se encuentran muy expresadas en el fruto y se acumulan, principalmente, en situaciones de estrés abiótico (Yubero-Serrano *et al.*, 2003). No obstante, la expresión en levaduras de LTPs y

profilinas de fresa aisladas a partir de una genoteca de ADNc, mostró una menor alergenicidad de estas proteínas que sus homólogos de manzana y/o melocotón, por lo que podrían ser empleadas en tratamientos de inmunoterapia (Zuidmeer *et al.*, 2006).

10. Importancia económica del fruto de fresa

La variedad *Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozier notho subsp. *ananassa* forma parte regular de la dieta de millones de personas y se cultiva en diferentes regiones del mundo, desde el Ártico hasta los Trópicos. Más de 80 países en el mundo presentan una producción significativa de fresa alcanzando en los últimos 20 años hasta 4.6 millones de toneladas métricas (FAO, 2012). La mayor parte de la producción tiene lugar en el hemisferio norte (98%), aunque no existen barreras genéticas ni climáticas que impidan la expansión hacia el sur. España representa el primer productor de fresa fresca de Europa y el segundo del mundo, tras Estados Unidos (FAO, 2012). EE.UU es el país líder en producción de fresa, con aproximadamente un 25% de la producción mundial, seguido por España, Turquía, Egipto, Rusia y Japón (Figura10) (FAO, 2012). La producción ha crecido de forma constante durante las dos últimas décadas en EE.UU., España, Turquía, Méjico y República de Corea; mientras que se ha reducido en los últimos años en Francia, Rusia, Italia y Japón, después de un aumento espectacular en los años 1970 y 1980. Si bien no existen datos oficiales referentes a la producción china, las estimaciones del departamento estadounidense de agricultura cifraron la producción en 1.950.000 millones de toneladas en la temporada 2009/2010 (<http://www.usdachina.org>).

En España, la producción total de fresa ha ido en aumento en las últimas décadas, alcanzando más de 500.000 Tm en el año 2011 y consiguiéndose una optimización en el ratio producción/Ha cultivada (FAO, 2012) (Figura 11). De las 290.000 Tm que representan la producción media anual española, el 95% se concentra en la provincia de Huelva (Freshuelva, 2005), de la cual el 80% es exportada (FAO, 2012) (Figura 12). No obstante, se estima que entre el 5 y el 25 % de la producción, dependiendo de la variedad, se pierde debido al reblandecimiento que sufre el fruto a lo largo de su maduración, a la infección por diferentes patógenos (infecciones favorecidas por el sistema de cultivo de la planta y por la siembra sucesiva sobre el mismo sustrato), así como por otros factores que afectan a la calidad del fruto (López-Aranda, 1997).

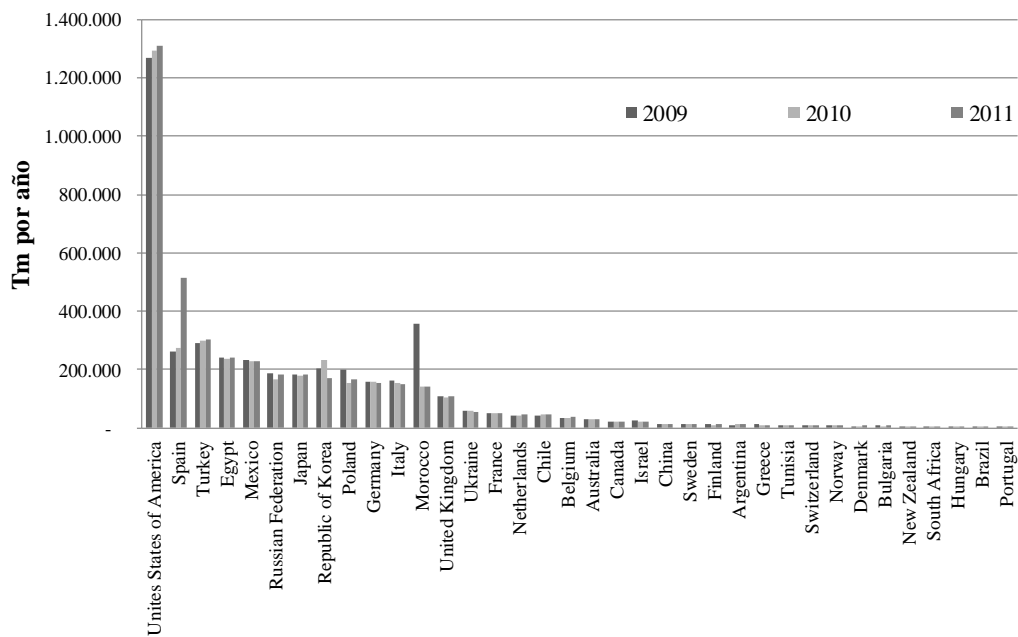


Figura10: Principales países productores de fresa en el mundo (FAO, 2012)



Figura11: Producción de fresa en España y área cultivada

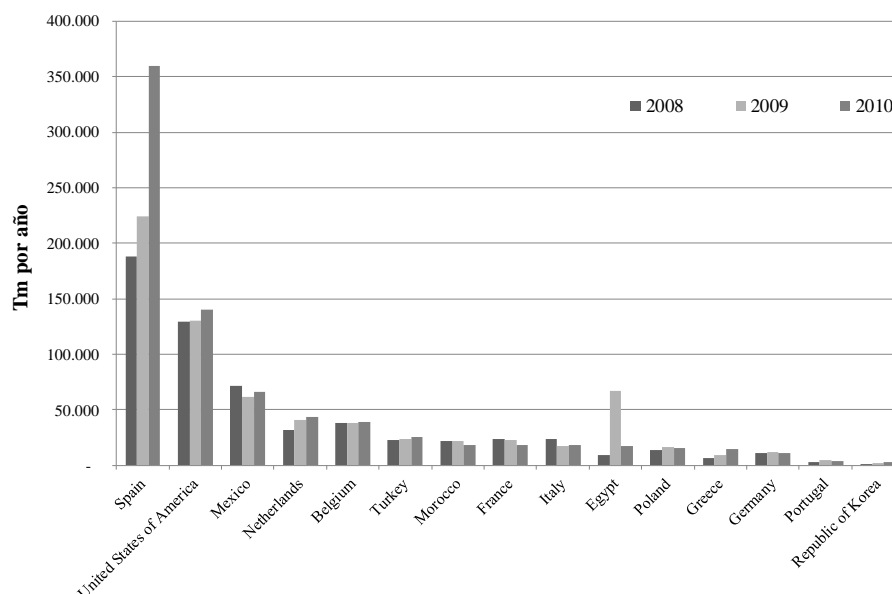


Figura12: Exportaciones mundiales de fresa (FAO, 2012)

Debido al coste de la investigación, la aplicación rentable de la biotecnología al cultivo de muchas frutas, verduras, árboles frutales y frutos secos está limitada. Además, la experimentación con cultivos perennes como árboles frutales, bayas y frutos secos es relativamente cara, ya que la unidad experimental es más grande y no es fácil sembrar plantaciones con nuevas variedades. De entre todos los frutos, la fresa es un cultivo especialmente interesante para la aplicación y para el desarrollo de biotecnología avanzada (incluyendo la clonación de genes y la tecnología recombinante) debido a su producción a gran escala y por su cultivo anual (Mezzetti, 2003). En general, las nuevas herramientas y sistemas de transgénicos desarrollados pueden ayudar a la industria de la fresa mediante su estudio a nivel molecular. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una transformación rápida de alto rendimiento que permita estudiar de manera eficiente la genómica funcional de este fruto. Así, y a pesar de los estudios realizados sobre la transformación de la fresa octoploide (Liu y Sanford, 1988; Nehra *et al.*, 1990.; Barcélo *et al.*, 1998; Passey *et al.*, 2003), la eficiencia de transformación varía entre diferentes cultivares, ya que se requieren de 40 a 112 días para la aparición de los primeros brotes visibles. No obstante, debido a la disponibilidad de algunos genotipos, a la regeneración eficiente y a la transformación de este cultivo, se considera un modelo interesante para el desarrollo de la genómica y de estudios de ADN recombinante entre las diferentes especies de Rosaceas.

REFERENCES

- Abeles FB, Takeda F.** 1990. Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae* **42**: 269-275.
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J.** 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**: 331-338.
- Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V.** 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177-181.
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FW, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ.** 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell* **16**: 3110-3131.
- Aharoni A, Keizer LCP, van der Broeck HC, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Bois G, Smit, P, de Vos RCH, O'Connell AP.** 2002a. Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and independent gene expression programs in strawberry, a nonclimacteric fruit. *Plant Physiology* **129**: 1019-1031.
- Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenow DB.** 2002b. Non targeted metabolome analysis by use of fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS, A Journal of Integrative Biology* **6**: 217-234.
- Aharoni A, O'Connell A.** 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2073-2087.
- Aharoni A, Vorst O.** 2001a. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* **48**: 99-118.
- Aharoni A, De Vos RCH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JNM, O'Connell A.** 2001b. The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal* **28**: 319-332.
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun ZK, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen A, de Vos RCH, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP.** 2000. Identification of the *SAAT* gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* **12**: 647-661.
- Albani MC, Battey NH, Wilkinson MJ.** 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around the SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 571-579.
- Alexander L, Grierson D.** 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1039-2055.
- Alleva K, Marquez M, Villareal N, Mut P, Bustamante C, Bellati J, Martínez G, Civello M, Amodeo G.** 2010. Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (*FaPIP2;1*) of strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3935-3945.
- Alm R, Ekefjard A, Krogh M, Hakkinen J, Emanuelsson C.** 2007. Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *Journal of Proteome Research* **6**: 3011-3020.

- Almeida J, D'Amico E, Preuss A, Carbone F, Ric de Vos CH, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG, 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**: 61–71.
- Amaya I, Osorio S, Martínez-Ferri E, Lima-Silva V, Doblaz VG, Fernández-Muñoz R, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V** (2015) Increased antioxidant capacity in tomato by ectopic expression of the strawberry D-galacturonate reductase gene. *Biotechnology Journal*. **10**: 490-500
- Anterola AM, Jeon JH, Davin LB, Lewis NG.** 2002. Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 18272- 80.
- Anttonen MJ, Hoppula KI, Nestby R, Verheul MJ, Karjalainen RO.** 2006. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **54**: 2614–2620.
- Archbold DD, Dennis FG.** 1984. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **109**: 330-335.
- Armitage AM.** 1989. Promotion of fruit ripening of ornamental peppers by ethephon. *HortScience* **24**: 962-964.
- Arroyo FT, Moreno J, Daza P, Boianova L, Romero F.** 2007. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **55**: 5701–5707.
- Asao HG, Nishizawa Y, Arai S, Sato T, Hirai M, Yoshida K.** 1997. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca fumuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotechnology* **14**: 145–149.
- Asao HG, Arai S, Nishizawa Y.** 2003. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Seibutsu Kogakkaishi* **81**: 57–63 (in Japanese with English Abstract).
- Asen S, Stewart RN, Norris KH.** 1972. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on colour. *Phytochemistry* **11**: 1139-1144.
- Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ.** 1994. Strawberry juice colour: A study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *Journal Science Food Agriculture* **64**: 31–37.
- 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**: 2088–2090.
- Barritt BH, Shanks CH. Jr.** 1980. Breeding strawberries for resistance to aphids *Chaetosiphon fragaefolii* and *C. tomassi*. *HortScience* **15**: 287–288.
- Barritt BH, Shanks CH. Jr.** 1981. Parent selection in breeding strawberries resistant to two-spotted spider mites. *HortScience* **16**: 323–324.
- Basu, A., A. Nguyen, N. M. Betts and T. J. Lyons.** 2014. Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**: 790-806.

- Batley NH, Tooke F.** 2002. Molecular control and variation in the floral transition. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 62–68.
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L.** 2004. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**: 366-380.
- Beekwilder J, Álvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FW, Bouwmeester HJ, Aharoni A.** 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology* **135**: 1865–1878.
- Ben-Arie R, Faust M.** 1980. ATPase in ripening strawberries. *Phytochemistry* **19**: 1631- 1636.
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 2002. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* **54**: 633-645.
- Blanco-Portales R, Medina-Escobar N, López-Ráez JA, González-Reyes JA, Villalba JM, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 2002. Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* **53**: 1723–1734.
- Blanco-Portales R, Pineda M, Muñoz-Blanco J.** 2003. Estudios moleculares sobre dos genes de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) relacionados con el proceso de maduración del fruto. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.
- Blanco-Portales R, López-Ráez JA, Bellido ML, Moyano E, Dorado G, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 2004. A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Molecular Biology* **55**: 763-780.
- Bombarely A, Merchante C, Csukasi F, Cruz-Rus E, Caballero JL, Medina-Escobar N, Blanco-Portales R, Botella MÁ, Muñoz-Blanco J, Sanchez-Sevilla J, 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**: 503.
- Bona E, Lingua G, Manassero P, Cantamessa S, Marsano F, Todeschini V, Copetta A, D'Agostino G, Massa N, Avidano L, Gamalero E, Berta G** (2015) AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza* **25**: 181-193
- Bradford E, Hancock JF, Warner RM.** 2010. Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**: 102–107.
- Bringham RS.** 1990. Cytogenetics and Evolution in American *Fragaria*. *HortScience* **25**: 879–881.
- Brown T, Wareing P.** 1965. Genetical control of everbearing habit and 3 other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica* **14**: 97–112.
- Brummell DA, Harpster MH.** 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**: 311-340.
- Brummell DA, Harpster M, Dunsmuir P.** 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology* **39**: 161-169.

- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D.** 2003. The molecular analysis of leaf senescence – a genomic approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 3-22.
- Bustamante CA, Rosli HG, Añón MC, Civello PM, Martínez GA.** 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**: 497-504.
- Bustamante CA, Civello PM, Martínez GA.** 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**: 49-56.
- Casanova E, Trillas MI, Moysset L, Vainstein A.** 2005. Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnology Advance*, **23**: 3–39.
- Casañal A, Zander U, Dupeux F, Valpuesta V, Marquez JA.** 2013. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* **69**: 510-514.
- Casañal A, Zander U, Muñoz C, Dupeux F, Luque I, Botella MA, Schwab W, Valpuesta V, Marquez JA.** 2013. The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *The Journal Biological Chemistry*, **49**: 35322-35332.
- Castillejo C, de la Fuente JI, Iannetta P, Botella MA, Valpuesta V.** 2004. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of *FaPE1*, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany* **55**: 909-918.
- Chalavi V, Tabaeizadeh Z, Thibodeau P.** 2003. Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 747–753.
- Chambers, A. H., J. Pillet, A. Plotto, J. Bai, V. M. Whitaker and K. M. Folta.** 2014. Identification of a strawberry flavor gene candidate using an integrated genetic-genomic-analytical chemistry approach. *BMC Genomics* **15**: 215-217.
- Cheng GW, Breen PJ.** 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 865-869.
- Cheng GW, Breen PJ.** 1992. Cell count and size in relation to fruit size among strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**: 946-950.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latche A, Lamon J, Bouzayen M.** 2004. Ethylene seems required for the Berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* **167**: 1301–1305.
- Cho HT, Kende H.** 1997. Expansins and intermodal growth of deepwater rice. *Plant Physiology* **113**: 1145-1151.
- Cipriani G, Testolin R.** 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. *Molecular Ecology Notes* **4**: 366–368.
- Civello PM, Martínez GA, Chaves AR. and Añón MC.** 1995. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **43**: 2596-2601.

- Civello PM, Powell ALT, Sabehat A, Bennett AB.** 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology***212**: 1273-1279.
- Cockshull KE, Graves CJ, Cave CRJ.**1992. The influence of shading on yield of glasshouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science***67**: 11-24.
- Concha, C. M., N. E. Figueroa, L. A. Poblete, F. A. Oñate, W. Schwab and C. R. Figueroa.** 2013. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry***70**: 433-444.
- Cosgrove DJ, Li ZC.** 1993. Role of expansins in cell enlargement of oat coleoptiles (analysis of developmental gradients and photocontrol). *Plant Physiology***103**: 1321-1328.
- Crecente-Campo J, Nunes-Damaceno M, Romero-Rodríguez MA, Vázquez-Odériz ML (2012) Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis* 28: 23-30
- Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, Kitamura J, Giavalisco P, Nakajima M, Fernie AR, Rathjen JP, Botella MA, Valpuesta V, Medina-Escobar N.** 2011. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist***191**: 376–390.
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, Hoffmann T, Sinz Q, Ring L, Studart-Wittkowski C, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.** 2012. The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany***63**, 4275-4290.
- Dai H, Lei J, Deng M.** 2007. Investigation and studies on classification of wild *Fragaria* spp. distributed in the Changbai Mountains. *Acta Horticulturae Sinica***34**: 63–66 [in Chinese with English summary]
- da Silva FL, Escribano-Bailn MT, Pérez Alonso JJ, Rivas-Gonzalo JC, Santos- Buelga C.** 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT – Food Science Technology***40**:374–382.
- Daminato M, Guzzo F, Casadoro G.** 2013. A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *Journal of Experimental Botany***64**: 3775-3786.
- Darnell RL, Martin GC.** 1988. Role of assimilate translocation and carbohydrate accumulation in fruit set of strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science***113**: 114-118.
- Darrow GM.** 1966. *The Strawberry*. New York: Holt, Rinehart & Winston.
- Davies C, Boss PK, Robinson SP.**1997. Treatment of grape berries, a non-climacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* **115**: 1155–1161.
- Davies PJ.** 2004. Introduction. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1–15.
- de la Fuente J, Amaya I, Castillejo C, Sanchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V.** 2006. The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation. *Journal of Experimental Botany***57**: 2401–2411.

- Dennis F.G.** 1984. Fruit development. *Physiological basis of crop growth and development*. M.B. Tesar, (Eds.) Madison: *American Society of Agronomy* 265-288.
- Denoyes-Rothan B, Guérin G, Lerceteau-Köhler E, Risser G.** 2005. Inheritance of a resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* **95**: 405–412.
- Dirinck PJ, De Pooter HL, Willaert GA, Schamp NM.** 1981. Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**: 316-321.
- Dotto MC, Martínez GA, Civello PM.** 2006. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology Biochemistry* **44**: 301– 307.
- Douillard C, Guichard E.** 1990. The aroma of strawberry (*Fragaria x ananassa*): characterization of some cultivars and influence of freezing. *Journal of Sciences of Food and Agriculture* **50**: 517-531.
- Dragišić Maksimović J, Poledica M, Mutavdžić D, Mojović M, Radivojević D, Milivojević J** (2015) Variation in nutritional quality and chemical composition of fresh strawberry fruit: combined effect of cultivar and storage. *Plant Foods Hum Nutr* **70**: 77-84
- Dreher TH, Poovaiah BW.** 1982. Changes in auxin content during development in strawberry fruit. *Journal of Growth Regulation* **1**: 267-276.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ, Wu YM, Huang YB, Tang YX.** 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* **74**: 1-11.
- Duangrisai S, Yamada K, Bantog NA, Shiratake K, Kanayama Y, Yamaki S.** 2007. Presence and expression of NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase and sorbitol-6- phosphate dehydrogenase genes in strawberry. *Journal Horticultural Science Biotechnology* **82**: 191–198.
- Durner EF, Barden JA, Himelrick DG, Poling EB.** 1984. Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, June-bearing and everbearing strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**: 306-400.
- Eshghi S, Tafazoli E.** 2007. Possible role of cytokinins in flower induction in strawberry. *American Journal Plant Physiology* **2**: 167–174.
- El-Kazzaz MK, Sommer NF, Forlage RJ.** 1983. Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. *Phytopathology* **73**: 282-285.
- El-Kereamy A, Chervin C, Roustan JP.** 2003. Exogenous ethylene stimulates the longterm expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum* **119**: 175-182.
- Erendorfer F.** 1983. Sinopsis del reino vegetal. En *Tratado de Botánica*, Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A.F.W., Von Denffer, D., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. y Ziegler, H. (Eds.). Barcelona: Omega, pp: 854-856.
- Eriksson T, Hibbs MS, Yoder AD, Delwiche CF, Donoghue MJ.** 2003. The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the trnL/F region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences* **164**: 197–211.
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerver P, Lamb C.** 2009. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interaction. *Plant physiology* **150**: 1750-1761.
- FAOSTAT** 2012. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). <http://faostat.fao.org>

- Federova NJ.** 1946. Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria*. *Compilation of the National Academy of Sciences USSR***52**: 545–547.
- Ferrarese L, Trainotti L, Moretto P, Polverino de Laureto P, Rascio N, Casadoro G.** 1995. Differential ethylene-inducible expression of cellulose in pepper plants. *Plant Molecular Biology***29**: 735–749.
- Ferrer J.** 1997. Las células de los tejidos vegetales. Ed. Vedral.
- Filippone MP, Diaz Ricci J, Mamaní deMarchese A, Farías RN, Castagnaro A.** 1999. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters***459**: 115–118.
- Fischer, T. C., B. Mirbeth, J. Rentsch, C. Sutter, L. Ring, H. Flachowsky, R. Habegger, T. Hoffmann, M.-V. Hanke and W. Schwab.** 2014. Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Phytologist***201**: 440-451.
- Folta KM, Staton M, Stewart PJ, Jung S, Bies DH, Jesdurai C, Main D.** 2005. Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*). *BMC Plant Biology***5**: 12.
- Folta KM, Davis TM.** 2006. Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences***25**: 399–415.
- Fonseca S, Hackler L. Jr, Zvara A, Ferreira S, Baldé A, Dudits D, Pais MS, Puskás LG.** 2004. Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. *Plant Science***167**: 457-469.
- Forney CF, Breen PJ.** 1985. Dry matter partitioning and assimilation in fruiting and deblossomed strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science***110**: 181-185.
- Forney CF, Breen PJ.** 1986. Sugar content and uptake in the strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science***111**: 241-247.
- Freshuelva** 2005. Asociación onubense de productores y exportadores de fresas. <http://www.freshuelva.es>
- Gapper N, McQuinn R, Giovannoni J.** 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology***82**: 575-591.
- García-Gago JA, Posé S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA.** 2009. The polygalacturonase *FaPG1* gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signaling & Behavior***4**: 766-768.
- Gardner N, Melberg T, George M, Smith AG.** 2006. Differential expression of rolC results in unique plant phenotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science***131**: 82–88.
- Gaston A, Perrotte J, Lerceteau-Köhler E, Rousseau-Gueutin M, Petit A, Hernould M, Rothan C, Denoyes B.** 2013. PFRU, a single dominant locus regulates the balance between sexual and asexual plant reproduction in cultivated strawberry. *Journal of Experimental Botany***64**: 1837-1848.
- Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M** (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct* **6**: 1386-1398
- Gil-Ariza DJ, Amaya I, Botella MA, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Sánchez-Sevilla JF.** 2006. EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry

(*Fragaria x ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes* **6**: 1195–1197.

Giménez G, Ballington JR. 2002. Inheritance of resistance to *Colletotrichum acutatum* Simmonds on runners of garden strawberry and its backcrosses. *HortScience* **37**: 686–690.

Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**: S170–S180.

Given NK, Venis NA, Grierson D. 1988a. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology* **133**: 25–30.

Given NK, Venis NA, Grierson D. 1988b. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climateric fruit. *Planta* **174**: 402–404.

Gomez-Cadenas A, Tadeo FR, Talon M, Primo-Millo E. 1996. Leaf Abscission Induced by Ethylene in Water-Stressed Intact Seedlings of Cleopatra Mandarin Requires Previous Abscisic Acid Accumulation in Roots. *Plant Physiology* **112**: 401–408.

Gong S, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K. 1997. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a form-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Molecular Biology* **35**: 915–927.

Graham J, Machray G, Manoir J. du, Roucou JF, McNicol RJ, Davies H, Du Manoir J. 1997b. Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars. *Acta Horticulturae* **439**: 161–163.

Green A. 1971. Soft Fruits. In *The Biochemistry of Fruits and their Products*. A.C. Hulme, ed. London: Academic Press, pp: 375–409.

Gu X, Chen Y, Gao Z, Qiao Y, Wang X (2015) Transcription factors and anthocyanin genes related to low-temperature tolerance in rd29A:RdreB1BI transgenic strawberry. *Plant Physiol Biochem* **89**: 31–43

Gu X, Gao Z, Zhuang W, Qiao Y, Wang X, Mi L, Zhang Z, Lin Z (2013) Comparative proteomic analysis of rd29A:RdreB1BI transgenic and non-transgenic strawberries exposed to low temperature. *J Plant Physiol* **170**: 696–706

Gulen, Eris. 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* **166**: 739–744

Guttridge CG, Jarret JM, Stinchcombe GR, Curtis PJ. 1977. Chemical induction of local reddening in strawberry fruits. *Journal of Sciences of Food and Agriculture* **28**: 243–246.

Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Törrönen AR. 2000. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**: 2960–2965.

Halbwirth H, Puhl I, Haas U, Jezik K., Treutter D, Stich K. 2006. Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **54**: 1479–1485.

Hancock JF, Luby JJ, Dale A, Callow PW, Serce S, El-Shiek. 2002. Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* **136**: 177–184.

Hancock JF. 1999. Strawberries. *Crop Production science in Horticulture*. CABI Publishing.

- Hannum SM.** 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of science. *Critical Reviews in Food Science* **44**: 1–17.
- Harbone JC.** 1973. Anthocyanins. In *Phytochemical methods*. London: Chapman & halls.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G.** 2010. Texture of Fresh Fruit. In *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp 121-224.
- Harpster MH, Brummell DA, Dunsmuir P.** 1998. Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo- β -1,4-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology* **118**: 1307-1316.
- Harpster MH, Lee KY, Dunsmuir P.** 1997. Isolation and characterization of a gene encoding endo- β -1,4-glucanase from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Molecular Biology* **33**: 47-59.
- Harrison RE, Luby JJ, Furnier GR.** 1997. Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria* spp.) taxa. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**: 63–68.
- Harrison EP, McQueen-Mason SJ, Manning K.** 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1437-1446.
- Havis AL.** 1943. A developmental analysis of strawberry fruit. *American Journal of Botany* **30**: 311-314.
- Haymes KM, Henken B, Davis TM, van de Weg WE.** 1997. Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 1097–1101.
- Heide OM, Sønsteby A.** 2007. Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Physiology* **130**: 280–289.
- Hemphill R, Martin LH.** 1992. Microwave oven-drying method for determining soluble solids in strawberries. *HortScience* **27**: 1326.
- Hirakawa H, Shirasawa K, Kosugi S, Tashiro K, Nakayama S, Yamada M, Kohara M, Watanabe A, Kishida Y, Fujishiro T, Tsuruoka H, Minami C, Sasamoto S, Kato M, Nanri K, Komaki A, Yanagi T, Guoxin Q, Maeda F, Ishikawa M, Kuhara S, Sato S, Tabata S, Isobe SN** (2014) Dissection of the Octoploid Strawberry Genome by Deep Sequencing of the Genomes of *Fragaria* Species. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* **21**: 169-181.
- Hirner AA, Veit S, Seitz HU.** 2001. Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-Airradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Science* **161**: 315- 322.
- Hirvi T, Hokanen E.** 1982. The volatiles of two new strawberry cultivars “Annelie” and “Alaska Pioneer”, obtained by cackcorssing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca* Ruegen and *Fragaria virginiana*. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchungund -Forschung Food Research and Technology* **175**: 113-116.
- Hiwasa K, Rose JC, Nakano R, Inaba A, Kubo Y.** 2003. Differential expression of seven α -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Plant Physiology* **117**: 564-572.
- Hjernø K, Alm R, Canbäck B, Matthiesen R, Trajkovski K, Björk L, Roespstorff P, Emanuelsson C.** 2006. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen inconcert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* **6**: 1574–1587.
- Hoad GV, Anderson HM, Guttridge CG, Sparks TR.** 1971. Ethylene and ripening of strawberry fruits. In Bristol University, Long Ashton Research Station Annual Report, pp: 33-34.

- Hobson GE.** 1993. Maduración del fruto. En *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto J. y Talón M., (Eds.). Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, pp: 4463-4478.
- Hobson G, Grierson D.** 1993. Tomato. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, eds. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman and Hall, 405–442.
- 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. *Plant Journal* **48**: 818–826.
- Hollman PCH., Venema DP.** 1993. The content of the potentially anticarcinogenic ellagic acid in plant foods. In: Waldron K.W., Johnson I.T. y Fenwick G.R. (Eds.). En *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, pp: 203-208.
- Houde M, Dallaire S, N'Dong D, Sarhan F.** 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 381- 387.
- Hou ZX, Huang WD.** 2005. Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction. *Planta* **222**: 678–687.
- Hubbard NL, Pharr DM, Huber SC.** 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Plant Physiology* **82**: 191-196.
- Huber DJ.** 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**: 1310–1315.
- Hummer KE, Hancock JH.** 2009. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies, Chap. 11. In: Folta KM, Gardiner SE (eds) *Plant genetics and genomics of crops and models*, vol 6: Genetics and genomics of Rosaceae. Springer, Germany, pp 413–435.
- Husaini AM, Abdin MZ.** 2008. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science* **174**: 446–455.
- Hytönen T, Elomaa P, Moritz T, Junttila O.** 2009. Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *Plant Biology* **9**: 18.
- Iannetta PP, Loorhoven LJ, Davies HV, Harren F.** 2000. Ethylene production by strawberry flowers and the ripening fruit. *Communication to the 9th international workshop on LASER based photoacoustic trace gas detection in life science*. Nijmegen, The Netherlands.
- Ichijima K.** 1926. Cytological and genetic studies on *Fragaria*. *Genetics* **11**: 590–603.
- Infoagro.** 2002. El cultivo de la fresa. http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/fresas.htm
- Iwata T, Omata I, Ogata K.** 1969a. Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. II. Respiratory pattern of fruits and its classification. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* **2**: 73-80.
- Iwata T, Omata I, Ogata K.** 1969b. Relationship between the ripening of harvested fruits and the respiratory pattern. III. Changes of ethylene concentration in fruits and responses to applied ethylene with relation to the respiratory pattern. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* **7**: 64-72.
- Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, Oyant LH, Araki T, Denoyes B, Foucher F.** 2012. The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant Journal* **69**: 116–125.

- Iwatsubo Y, Naruhashi N.** 1989. Karyotypes of three species of *Fragaria* (Rosaceae). *Cytologia***54**: 493–497.
- Janes HW, Chin CK, Frenkel C.** 1978. Respiratory upsurge in blueberries and strawberries as influenced by ethylene and acetaldehyde. *Botanical Gazette***139**: 50-52.
- Jewell GG, Rantsios A, Scholey J.** 1973. Factors influencing the breakdown of fruit in strawberry jam. *Journal of Texture Studies***4**: 363–370.
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L. and Shen YY.** 2011. Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. *Plant Physiology***157**:188-99.
- Jiang Y, Joyce DC, Terry LA.** 2001. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biology and Technology***23**: 227-232.
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevaldo J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA.** 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology***128**: 751-759.
- Jiménez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P.** 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta***214**: 754-758.
- Kader AA.** 1991. Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. In Luby J.J., Dale A. (Eds.). *The Strawberry into the 21st century*. Timber Press, Portland, OR, pp: 145-152.
- Kalt W, Prange RK, Lidster PD.** 1993. Postharvest color development of strawberries: The influence of maturity, temperature and light. *Can. Journal Plant Science***73**: 541–548.
- Kano Y, Asahira T.** 1978. Effect of some growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science***47**: 195-202.
- Kano Y, Asahira T.** 1979. Effect of the endogenous cytokinins in strawberry fruits on their maturing. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science***47**: 433-472
- Kano Y, Asahira T.** 1981. Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawberry fruits. *Journals of the Japanese Society of Horticultural Science***50**: 31-36.
- Karlsson AL, Alm R, Ekstrand B, Fjelkner-Modig S, Schiött A, Bengtsson U, Björk L, Hjernø K, Roepstorff P, Emanuelsson CS.** 2004. Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy***59**: 1277–1284
- Keller E, Cosgrove DJ.** 1995. Expansins in growing tomato leaves. *Plant Journal***8**: 795-802.
- Keniry A, Hopkins CJ, Jewell E, Morrison B, Spangenberg GC, Edwards D, Batley J.** 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria x ananassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes***6**: 319–322.
- Khammuang S, Dheeranupattana S, Hanmuangja P, Wongroung S.** 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry. *Songklanakarinn Journal Science Technology***27**: 693–703.
- Klee HJ, Clark DG.** 2004. Ethylene signal transduction in fruits and flowers. In: Davies PJ, ed. *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 369–390.

- Knee M, Sargent JA, Osborne DJ.** 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany***28**: 977-996.
- Koskela EA, Mouhu K, Albani MC, Kurokura T, Rantanen M, Sargent DJ, Battey NH, Coupland G, Elomaa P, Hytönen T.** 2012. Mutation in TERMINAL FLOWER1 reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology***159**: 1043-1054.
- Kurokura T, Inaba Y, Sugiyama N.** 2006. Histone H4 gene expression and morphological changes on shoot apices of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during floral induction. *Science Horticultural***110**: 192–197.
- Landi L, Mezzetti B.** 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Reports***25**:281–288.
- Larsen M, Poll L.** 1992. Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung Food Research and Technology***195**: 120-123.
- Larsen M, Poll L, Olsen CE.** 1992. Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivars by use of odour threshold values. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung Food Research and Technology***195**: 536-539.
- Lazarus CM, MacDonald H.** 1996. Characterization of a strawberry gene for auxinbinding protein, and its expression in insect cells. *Plant Molecular Biology***31**: 267–277.
- Lee RC, Hrmona M, Burton RA, Lahnstein J, Fincher GB.**2003. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity. *Journal of Biological Chemistry***278**: 5377-5387.
- Lei J, Li Y, Du G, Dai H, Deng M.** 2005. A natural pentaploid strawberry genotype from the Changbai Mountains in Northeast China. *Science Horticultural***40**:1194–1195.
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S.** 2003. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology***6**: 603-610.
- Leshem YY, Pinchasov Y.** 2000. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana*(Mill.). *Journal of Experimental Botany***51**: 1471-1473.
- Lewers KS, Styan SMN, Hokanson SC, Bassil NV.**2005. Strawberry GenBank derived and genomic simple sequence repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science***130**: 102–115.
- Li, L., J. Song, W. Kalt, C. Forney, R. Tsao, D. Pinto, K. Chisholm, L. Campbell, S. Fillmore and X. Li.** 2013. Quantitative proteomic investigation employing stable isotope labeling by peptide dimethylation on proteins of strawberry fruit at different ripening stages. *Journal of Proteomics***94**: 219-239.
- Lim CW, Lee SC** (2015) Arabidopsis abscisic acid receptors play an important role in disease resistance. *Plant Molecular Biology* **88**: 313-324
- Lim KY.** 2004. Karyotype and ribosomal gene mapping in *Fragaria vesca* L. *Acta Horticulturae*, **649**: 103–106.

- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC.** 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology***10**, 50.
- Lis EK, Borkowska B, Antoszewski R.** 1978. Growth regulators in the strawberry fruit. *Fruit Science Report***5**: 17-29.
- Lis EK, Antoszewski R.** 1979. Modification of the strawberry receptacle accumulation ability by growth regulators. En *Photosynthesis and Plant Development*. R. Marcell, H. Clijster, M. van Poucke (Eds.) La Haya: Dr. W. Junk Ed.: 263-270.
- Liu ZR, Sanford JC.** 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *HortScience***23**: 1057-1059.
- Llop-Tous I, Domínguez-Puigianer E, Palomer X, Vendrell M.** 1999. Characterization of two divergent endo b-1,4 glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimateric strawberry fruit. *Plant Physiology***119**: 1451-1421.
- Llop-Tous I, Dominguez-Puigjaner E, Vendrell M.** 2002. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. *Journal of Experimental Botany***53**: 2283–2285.
- Lopes-da-Silva F, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C (2002) Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology* 214: 248-253
- Lopez AP, Portales RB, Lopez-Raez JA, Medina-Escobar N, Muñoz-Blanco J, Franco AR.** 2006. Characterization of a strawberry late-expressed and fruit-specific peptide methionine sulphoxide reductase. *Plant Physiology***126**: 129–139.
- López-Aranda JM.** 1997. Informe final de la mesa de expertos del sector de la fresa. Plan de Modernización de la Agricultura Andaluza.
- López-Aranda JM.** 2008. El cultivo de la fresa en Huelva. En: La Fresa de Huelva. Ed: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- López-Ráez JA, Moyano E, Muñoz-Blanco J.** 2003. Caracterización de genes relacionados con el metabolismo de los fenilpropanoides en el fruto de la fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.
- Loughrin JH, Kasperbauer MJ.** 2002. Aroma of fresh strawberries is enhanced by ripening over red versus black mulch. *Journal of Agricultural Food Chemistry***50**: 161–165.
- Lunkenbein S, Bellido ML, Aharoni A, Salentijn EMJ, Kaldenhoff R, Colner A, Muñoz-Blanco J, Schwab W.** 2006. Cinnamate metabolism in ripening fruit: characterisation of an UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Physiology*, **140**: 1047-1058.
- Lüthje S, Meisrimler CN, Hopff D, Möller B.** 2011. Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry***72**: 1124-1135.
- Maas JL, Galletta GJ, Stoner GD.** 1991. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially strawberry: A review. *HortScience***26**: 10–14.

- Maas JL, Wang SY, Galletta GJ.** 1996. Health enhancing properties of strawberry fruit. In: Pritts M.P., Chandler C.K. and Crocker T.E. (Eds.) *Proceedings of the IV North American Strawberry Conference*, Orlando, Florida, pp: 11-18.
- Maas JL, Guoin-Behe C, Hartung JS, Hokanson SC.** 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *HortScience*, **35**: 128–131.
- Mabberley DJ.** 2002. *Potentilla* and *Fragaria* (Rosaceae) reunited. *Telopea*, **9**(4):793–801.
- Makinen KK, Söderling E.** 1980. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol and xylosa in wild berries and commercial fruits. *Journals of Food Science* **45**: 367-371.
- Manning K.** 1993. Soft fruits. In *Biochemistry of fruit ripening*. G. Seymour, J. Taylor and G.A. Tucker, (Eds.) London: Chapman & Hall, pp: 347-378.
- Manning K.** 1994. Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* **194**: 62-68.
- Manning K.** 1998. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* **205**: 622-630.
- Martínez GA, Chaves AR, Añón MC.** 1996. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Plant Growth Regulation* **15**: 139–146.
- Martínez GA, Chaves AR, Civello PM.** 2004. Beta-xylosidase activity and expression of a beta-xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 89-96.
- Martínez-Zamora MG, Castagnaro AP, Díaz Ricci JC.** 2004. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries. *Molecular Genetics Genomics* **272**: 480–487.
- Martínez M, Abraham Z, Gambardella M, Echaide M, Carbonero P, Diaz I.** 2005. The strawberry gene *Cyfl* encodes a phytoalexin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1821–1829.
- Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C.** 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**: 58-65.
- Mathews H, Wagoner W, Kellog J, Bestwick R.** 1995. Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **31**: 36–43.
- Mazzara M, Mezzetti B, James JD, Negri P.** 1998. Il gene *rolC* in fragola. *L'informatore Agrario* **29**: 46–49.
- McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K.** 2013. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science* **17**: 4:79.
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ.** 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 6574-6578.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ.** 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433.

- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero JL.** 1997a. Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical Biochemistry* **248**: 288-296.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 1997b. 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**: 867-877.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL.** 1998. Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding to a mRNA for a low molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology* **36**: 33-42.
- Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F, Hoffmann T, Ring L, Rodríguez-Franco A, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.** 2014. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoids/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* **65**, 401-417.
- Medina-Puche L, Molina-Hidalgo FJ, Boersma M, Schuurink RC, López-Vidriero I, Solano R, Franco-Zorrilla J-M, Caballero JL, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiology* **168**: 598-614
- Mercado JA, Trainotti L, Jiménez-Bermúdez L, Santiago-Doménech N, Posé S, Donolli R, Barceló M, Casadoro G, Pliego-Alfaro F, Quesada MA.** 2010. Evaluation of the role of the endo- β -(1,4)-glucanase gene *FaEG3* in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* **55**: 8-14.
- Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Quesada MA.** 2011. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. In: Jenks MA, Bebeli PJ, eds. *Breeding for fruit quality*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell 81-104.
- Merchante C, Vallarino JG, Osorio S, Aragüez I, Villarreal N, Ariza MT, Martínez GA, Medina-Escobar N, Civello MP, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V.** 2013. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4421-4439.
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A.** 2004b. The *defH9-iaaM* auxin synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology* **4**: 4.
- Mezzetti B.** 2003. Genetic transformation in strawberry and raspberry. In: *Plant Genetic Engineering*, Vol. 6 Improvement of Fruit Crops. Eds. Pawan K. Jaiwal and Rana P. Singh. S.C.I. Tech Publishing L.L.C., Houston, T.X.
- Minic Z, Rihouey C, Trung Do C, Lerouge P, Jouanin L.** 2004. Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**: 1-12.
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X.** 2006. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**: 264-266.
- Mitiouchkina TY, Dolgov SV.** 2000. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes* introduction. *Acta Horticulturae* **508**: 163-169.
- Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.** 2013. The strawberry (*Fragaria x ananassa*)

fruit-specific *rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1)* gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell walls middle lamellae. *Journal of Experimental Botany* **64**, 1471-1483.

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Gelis S, Ramos J, Sabir F, Soveral G, Prista C, Iglesias-Fernández R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2015) Functional characterization of FaNIP1;1 gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Science* **238**: 198-211

Moore JN, Brown GR, Brown ED. 1970. Comparison of factors influencing fruit size in large-fruited and small-fruited clones of strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **95**: 827-831.

Mori T, Sakurai M, Sakuta M. 2001. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Science* **160**: 355-360.

Mori S, Kitamura H, Kuroda K. 2005. Varietal differences in Fusarium wilt-resistance in strawberry cultivars and the segregation of this trait in F1 hybrids. *Journal of the Japanese Society HortScience* **74**: 57-59.

Monfort A, Vilanova S, Davis TM, Arús P. 2006. A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria x ananassa*. *Molecular Ecology* **6**: 197-200.

Mouhu K, Hytönen T, Folta K, Rantanen M, Paulin L, Auvinen P, Elomaa P. 2009 Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biology*, **9**: 122

Moyano-Cañete E, Bellido ML, García-Caparrós N, Medina-Puche L, Amil-Ruiz F, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2013. *FaGAST2*, a strawberry ripening-related gene, acts together with *FaGAST1* to determine cell size of the fruit receptacle. *Plant & Cell Physiology* **54**: 218-236.

Moyano E, Encinas S, López JA, Redondo J, Blanco R, Bellido ML, Sanz C, Caballero JL, Muñoz-Blanco J. 2004. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Science* **166**: 835-845.

Moyano E, Portero-Robles I, Medina-Escobar N, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero JL. 1998. A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiology* **117**: 711-716.

Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M, Botella JR. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *Journal of Experimental Botany* **56**: 101-112.

Muñoz C, Hoffman T, Medina Escobar N, Ludemann F, Botella MA, Valpuesta V, Schwab W. 2010. The Strawberry fruit Fra a Allergen functions in Flavonoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **3**: 113-124.

Musidlowska-Persson A, Alm R, Emanuelsson C. 2007. Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence. *Molecular Immunology* **44**: 1245-1252.

Mussinán CJ, Walradt JP. 1975. Organic acids from fresh California strawberries. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry* **23**: 482-484.

- Mut P, Bustamante C, Martínez G, Alleva K, Sutka M, Civello M, Amodeo G.** 2008. A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening. *Physiologia Plantarum***132**, 538-551.
- Nakano Y, Higuchi Y, Yoshida Y, Hisamatsu T** (2015) Environmental responses of the FT/TFL1 gene family and their involvement in flower induction in *Fragaria × ananassa*. *J Plant Physiol* **177**: 60-66
- Nardi C, Escudero C, Villarreal N, Martínez G, Civello PM** (2013) The carbohydrate-binding module of *Fragaria × ananassa* expansin 2 (CBM-FaExp2) binds to cell wall polysaccharides and decreases cell wall enzyme activities "in vitro". *J Plant Res* **126**: 151-159
- Nardi CF, Villarreal NM, Rossi FR, Martínez S, Martínez GA, Civello PM** (2015) Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Molecular Biology* **88**: 101-117
- NDong C, Quellet F, Houde M, Sarhan F.** 1997. Gene expression during cold acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiology***38**: 863–870.
- Neal GE.** 1965. Changes occurring in the cell walls of strawberries during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***16**: 604-611.
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL, Stushnoff C.** 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Reports***9**: 293–298.
- Nier S, Simpson DW, Tobutt KR, Sargent DJ.** 2006. Construction of a genetic linkage map of an interspecific diploid *Fragaria* BC1 mapping population (*F. vesca* 815 × [*F. vesca* 815 × *F. viridis* 903]) and its comparison to the *Fragaria* reference map (*FVxFN*). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology***81**: 645–650.
- Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, Sandberg G, Olsson O.** 1996. Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiology***112**: 493–502.
- Nitsch JP.** 1950. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany***37**: 211-215.
- Nogata Y, Ohta H, Voragen AGJ.** 1993. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry***34**: 617-620.
- Ofosu-Anim J, Yamaki S.** 1994. Sugar content, compartmentation and efflux in strawberry tissues. *Journal of the American Society for Horticultural Science***119**: 1024-1028.
- Ofosu-Anim J, Kanayama Y, Yamaki S.** 1996. Sugar uptake into strawberry fruits is stimulated abscisic acid and indolacetic acid. *Physiologia Plantarum***97**: 169-174.
- Olías JM, Sanz C, Ríos JJ, Perez AG.** 1995. Substrate specificity of alcohol acyltransferase from strawberry and banana fruits. In *Fruit Flavors: Biogenesis, Characterization and Authentication*, R.L. Rouseff and M.M. Leahy, eds. Washington, DC, *American Chemical Society*, pp. 134–141.
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell***14**: S61–S80.

- Oosumi T, Gruszewski HA, Blischak LA, Baxter AJ, Wadl PA, Shuman JL, Veilleux RE, Shulaev V.** 2006. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* **223**: 1219–1230.
- Ornelas-Paz Jde J, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, Pérez-Martínez JD, Escalante-Minakata Mdel P, Ibarra-Junquera V, Acosta-Muñiz C, Guerrero-Prieto V, Ochoa-Reyes E.** 2013. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry* **1**; **138**: 372–81.
- Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, Dalla Rizza M, Mezzetti B, Ruggieri S.** 2001. Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline-containing factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 21578–21584.
- Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V.** 2008. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Journal* **54**: 43–55.
- Owens CL, Thomashow MF, Hancock JF, Iezzoni AF.** 2002. CPF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 462–710.
- Ozawa T, Lilley TH, Haslam E.** 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* **26**: 2937–2942.
- Palomer X, Llop-Tous I, Vendrell M, Krens FA, Schaart JG, Boone MJ.** 2006. Antisense downregulation of strawberry endo- β -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* **171**: 640–646.
- Pandey S, Rahade SA, Nagr PK, Kumar N.** 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Bioscience* **25**: 291–299.
- Paniagua C, Posé S, Morris VJ, Kirby AR, Quesada MA, Mercado JA.** 2014. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany* **114**: 1375–1383.
- Park JI, Kim IJ.** 2007. Changes in the expression of ADP-glucose pyrophosphorylase genes during fruit ripening in strawberry. *Food Science Biotechnology* **16**: 343–348.
- Park JI, Lee YK, Chung WI, Lee IH, Choi JH, Lee WM, Ezura H, Lee SP, Kim IJ.** 2006. Modification of sugar composition in strawberry fruit by antisense suppression of an ADP-glucose pyrophosphorylase. *Molecular Breeding* **17**: 269–279.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X.** 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **12**: 1484–1495.
- Passey AJ, Barrett KJ, James DJ.** 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports* **21**: 397–401.
- Pearce BD, Grange RI, Hardwick K.** 1993. The growth of young tomato fruit. II. Environmental influences on glasshouse crops grown in rockwool or nutrient film. *Journal of Horticultural Science* **118**: 245–258.

- Pérez AG, Olías R, Sanz C, Olías JM.** 1996. Furanones in strawberries: evolution during ripening and postharvest shelf life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***44**: 3620-3624.
- Pérez AG, Sanz C, Olías R, Ríos JJ, Olías JM.** 1993. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***41**: 1462-1466.
- Perkins-Veazie P, Huber DJ.** 1987. Growth and ripening of strawberry fruit under field conditions. *Proceedings of Florida State Horticultural Society***100**: 253-256.
- Perkins-Veazie P.** 1995. Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Review***17**: 267-297.
- Perkins-Veazie P, Huber DJ, Brecht JK.** 1995. Characterization of ethylene production in developing strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* **17**: 33-39.
- Perkins-Veazie PM, Huber DJ, Brecht JK.** 1996. In vitro growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. *Annals of Applied Biology***128**: 105-116.
- Pharis RP, King RW.** 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology***36**: 517-568.
- Pillet J, Yu H-W, Chambers AH, Whitaker VM, Folta KM** (2015) Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *Journal of Experimental Botany* **6**: 4455-4467.
- Posé S, Paniagua C, Cifuentes M, Blanco-Portales R, Quesada MA, Mercado JA.** 2013. Insights into the effects of polygalacturonase *FaPG1* gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany***64**: 3803-3815.
- Potter D, Luby JJ, Harrison RE.** 2000. Phylogenetic relationships among species of *Fragaria* (Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany* **25**: 337-348.
- Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN.** 2007. Fruit ripening phenomena- An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition***47**: 1-19.
- Pyysalo T, Honkanen E, Hirvi T.** 1979. Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L. compared to those of cultivated berries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Segana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***27**: 19-22.
- Quesada MA, Blanco-Portales R, Pose S, García-Gago JA, Jiménez-Bermúdez S, Muñoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, 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.
- Raab T, López-Ráez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Muñoz-Blanco J.** 2006. FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell***18**: 1023-1037.
- Rajashekar CB, Zhou H, Marcum KB, Prakash O.** 1999. Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants. *Plant Science***148**: 175-183.
- Ranwala AP, Suematsu C, Masuda H.** 1992. Soluble and wall-bound invertases in strawberry fruit. *Plant Science***84**: 59-64.
- Rantanen M, Kurokura T, Jiang P, Mouhu K, Hytönen T** (2015) Strawberry homologue of terminal flower1 integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering. *Plant J* **82**: 163-173

- Rantanen M, Kurokura T, Mouhu K, Pinho P, Tetri E, Halonen L, Palonen P, Elomaa P, Hytönen T** (2014) Light quality regulates flowering in FvFT1/FvTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Front Plant Sci* **5**: 271
- Reddy ASN, Poovaiah BW.**1990. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for a auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. *Plant Molecular Biology***14**: 127-136.
- Reddy ASN, Jena PK, Mukherjee SK, Poovaiah BW.**1990. Molecular cloning of cDNAs for auxin-induced mRNAs and developmental expression of the auxin-inducible genes. *Plant Molecular Biology***14**: 643-653.
- Redgwell RJ, Fischer M, Kendall E, MacRae EA, Perry J, Harker R.** 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta***203**: 174–181.
- Redondo-Nevado J, Moyano E, Medina-Escobar N, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 2001. A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany***52**: 1941-1945.
- Reyes FGR, Wrolstad RE, Cornwell CJ.** 1982. Comparison of enzymic, gas-liquid chromatographic and high performance liquid chromatographic methods for determining sugars and organic acids in strawberries at three stages of maturity. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists***65**: 126-131.
- Ricardo VG, Ricci JCD, Hernández L, Castagnaro AP.** 2006. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. *Transgenic Research***15**:57–68.
- Ring L, Yeh SY, Hücherig S, Hoffmann T, Blanco-Portales R, Fouche M, Villatoro C, Denoyes B, Monfort A, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Gershenson J, Schwab W.** 2013. Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase *FaPRX27* in strawberry fruit. *Plant Physiology***163**: 43-60.
- Roscher R, Schreier P, Schwab W.** 1997. Metabolism of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached strawberry fruits. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 3202–3205.
- Roscher R, Bringmann G, Schreier P, Schwab W.** 1998. Radiotracer studies of the formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***46**: 1488-1493.
- Rose J, Lee H, Bennett A.** 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA***94**: 5955-5960.
- Rosin FM, Aharoni A, Salentijn EMJ, Schaart JG, Boone MJ, Hannapel DJ.** 2003. Expression patterns of a putative homolog of AGAMOUS, STAG1, from strawberry. *Plant Science***165**: 959–968.
- Rosli HG, Civello PM, Martínez GA.** 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Journal of Physiology and Biochemistry***42**: 823–831.
- Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Aïnouche A, Aïnouche ML, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B.** 2008. Origin and evolution of the polyploid *Fragaria* species through phylogenetical

analyses of GBSSI and DHAR low-copy nuclear genes. <http://www.adelaide.edu.au/acad/events/> accessed 07/07/2008.

Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Aïnouche A, Aïnouche ML, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 515-530.

Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, Jenks MA, Goodwin SM, Niklas KJ, Xiaolin R, Labavitch JM, Shackel KA, Fernie AR, Lytovchenko A, O'Neill MA, Watkins CB, Rose JK. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology* **144**: 1012–1028.

Salentijn EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA. 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Plant Physiology* **118**: 571-578.

Salvatierra A, Pimentel P, Moya-León MA, Herrera R. 2013. Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of *FcMYB1* gene. *Phytochemistry* **90**: 25–36.

Santiago-Doménech N, Jiménez-Bemúdez S, Matas AJ, Rose JKC, Muñoz-Blanco J, Mercado JA, Quesada MA. 2008. Antisense Studies of the changes in receptacle and achene proteome along the ripening process of *Fragaria x ananassa* and analysis of transgenic fruits of *Fragaria vesca* that express *FaPEI* 191 inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerisation in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2769-2779.

Sargent DJ, Hadonou AM, Simpson DW. 2003. Development and characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. *Molecular Ecology Notes* **3**: 550–552.

Sargent DJ, Geibel M, Hawkins JA, Wilkinson MJ, Battey NH, Simpson DW. 2004a. Quantitative and qualitative differences in morphological traits revealed between diploid *Fragaria* species. *Annals of Botany* **94**: 787–796

Sargent DJ. 2005. A genetic investigation of diploid *Fragaria*. *PhD thesis, The University of Reading*, pp. 223.

Sargent DJ, Clarke J, Simpson DW, Tobutt KR, Arús P, Monfort A, Vilanova S, Denoyes-Rothan B, Rousseau M, Folta KM, Bassil NV, Battey NH. 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1349–1359.

Sargent DJ, Rys A, Nier S, Simpson DW, Tobutt KR. 2007. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 373–384.

Sas L, Miszczak A, Plich H. 1992. The influence of auxins, exogenous ethylene and light on the biosynthesis of ethylene and CO₂ production in strawberry fruits. *Fruit Science Report* **19**: 47-61.

Schaart, J. G., C. Dubos, I. Romero De La Fuente, A. M. M. L. van Houwelingen, R. C. H. de Vos, H. H. Jonker, W. Xu, J.-M. Routaboul, L. Lepiniec and A. G. Bovy. 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *New Phytologist* **197**: 454-467.

- Schaart JG, Mehli L, Schouten HJ.** 2005. Quantification of allele-specific expression of a gene encoding strawberry polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) using Pyrosequencing. *Plant Journal***41**: 493–500.
- Schmulling T, Schell J, Spena A.** 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO Journal***7**: 2621–2629.
- Seeram NP.** 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***56**: 627–629.
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García Martínez JL.** 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology***145**: 246–257.
- Senanayake YDA, Bringham RS.** 1967. Origin of *Fragaria* polyploids I. Cytological analysis. *American Journal of Botany* **54**: 221–228.
- Sesmero R, Quesada MA, Mercado JA.** 2007. Antisense inhibition of pectate lyase gene expression in strawberry fruit: characteristics of fruits processed into jam. *Journal of Food Engineering***79**: 194–199.
- Seutter von Loetzen C, Schweimer K, Schwab W, Rösch P, Hartl-Spiegelhauer O.** 2012. Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Bioscience reports***32**: 567-575.
- Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, eds.** 1993. Biochemistry of fruit ripening. London: Chapman & Hall.
- Seymour GB, Ryder CD, Cevik V, Hammond JP, Popovich A, King GJ, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Manning K.** 2011. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *Journal of Experimental Botany***62**: 1179-1188.
- Shaw DV, Hansen J, Browne GT, Shaw SM.** 2008. Components of genetic variation for resistance of strawberry to *Phytophthora cactorum* estimated using segregating seedling populations and their parent genotypes. *Plant Pathology*, **57**: 210–215.
- Sharp RE, Le Noble ME.** 2002. *Journal of Experimental Botany***53**: 33-37.
- Shieberle P, Hofmann T.** 1997. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***45**: 227-232.
- Shinozaki K., Yamaguchi- Shinozaki K.** 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany***58**: 221-227.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton J.-M, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Rojas JJR, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troggio M, Viola R, Ashman T-L, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Girona EL, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman**

- AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM.** 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**: 109–116.
- Smith BJ, Galletta GJ, Gupton CL.** 1996. USDA-ARS strawberry resistance breeding, disease biology and management progress. In: Proceedings of IV North American Strawberry Conference. *University of Florida, Gainesville, FL*, pp 253–258.
- Sønsteby A, Heide OM.** 2007. Long-day control of flowering in everbearing strawberries. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **82**: 875–884.
- Sønsteby A, Heide OM.** 2008. Long-day rather than autonomous control of flowering in the diploid everbearing strawberry *Fragaria vesca* ssp *semperflorens*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **83**: 360–366.
- Spolaore S, Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G.** 2003. Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo- β -1,4-glucanase in the non-climateric strawberry. *Journal of Experimental Botany* **54**: 271–277.
- Spayd SE, Morris JR.** 1981. Physical and chemical characteristics of pure from onceover harvested strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**: 101–105.
- Staudt GS.** 1989. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Horticulturae* **265**: 23–34.
- Staudt GS.** 1999a. Systematics and Geographic Distribution of the American Strawberry Species. *University of California. Publication in Botany*. Vol. **81**, 162 pp.
- Staudt GS.** 1999b. Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria nilgerrensis* Schltdl. ex J. Gay. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **121**: 297–310.
- Staudt GS.** 2003. Notes on Asiatic *Fragaria* species: III. *Fragaria orientalis* Losinsk. And *Fragaria mandshurica* spec. nov. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **124**: 397–419
- Staudt GS.** 2005. Notes on Asiatic *Fragaria* species: IV. *Fragaria inumae* Makino. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **126**: 163–175
- Staudt GS, Dickor'e WB.** 2001. Notes on Asiatic *Fragaria* species: *Fragaria pentaphylla* Losinsk. and *Fragaria tibetica* spec. nov. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **123**: 341–354
- Stewart PJ, Folta KM.** 2010. A review of photoperiodic flowering research in strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**: 1–13.
- Stutte GW, Darnell RL.** 1987. A non-destructive developmental index for strawberry. *HortScience* **22**: 218–221.
- Sugimoto T, Tamaki K, Matsumoto J, Yamamoto Y, Shiwaku K, Watanabe K.** 2005. Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. *Plant Breeding* **124**: 498–501.
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR.** 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* **140**: 150–158.
- Symons GM, Chua YJ, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB.** 2012. Hormonal changes during non-climateric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4741–4750.

- Tesniere C, Pradal M, El-Kereamy A, Torregrosa L, Chatelet P, Roustan JP, Chervin C.** 2004. Involvement of ethylene signalling in a non-climateric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. *Journal of Experimental Botany***55**: 2235-2240.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JR, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S.** 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta***6**: 1-16
- Thomas TR, Matthews MA, Shackel KA.** 2006. Direct in situ measurement of cell turgor in grape (*Vitis vinifera* L.) berries during development and in response to plant water deficits. *Plant, Cell, & Environment***29**: 993–1001.
- Thompson PA.** 1963. The development of embryo, endosperm and nucellus tissues in relation to receptacle growth in the strawberry. *Annals of Botany***27**: 589-605.
- Timberlake CF.** 1981. Anthocyanins in fruit and vegetables. In *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*. J. Friend and M.J.C. Rhodes, eds. London: Academic Press, pp: 221-247.
- 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**: 2037-2046.
- Trainotti L, Spinello R, Piovan A, Spolaore S, Casadoro G.** 2001. β - galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *Journal of Experimental Botany***52**: 1635-1645.
- Trainotti L, Ferrarese F, Dalla-Vecchia F, Rasico N, Casadoro G.** 1999. Two different endo-b-1-4-glucanases contribute to the softening of the strawberry fruits. *Journal of Plant Physiology* **154**: 355-362.
- Tressl R, Drawert F, Heimann W.** 1969. Gaschromatographischmassen spektrometrische Bestandsaufnahme von Erdbeer-Aromastoffen. *Zeitschrift für Naturforschung***24**: 1201-1202.
- Tucker GA.** 1993. Introduction. In: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA, eds. Biochemistry of fruit ripening. London: Chapman and Hall, 1–52.
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CH, Capanoglu E, Bovy A, Battino M.** 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **56**: 696–704.
- Valério L, De Meyer M, Penel C, Dunand C.** 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry***65**: 1331-1342.
- Vallarino JG, Osorio S, Bombarely A, Casañal A, Cruz-Rus E, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I, Giavalisco P, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V.** 2015. Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytologist* **208**: 482-496.
- Veluthambi K, Poovaiah BW.** 1984. Auxin-regulated polypeptide changes at differential stages of strawberry fruit development. *Plant Physiology***75**: 349-353.
- Vij S, Tyagi AK.** 2007. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal***5**: 361–380.
- Vilanova S, Arús P, Sargent DJ, Monfort A.** 2008. Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC Plant Biology***8**: 67.

- Villarreal NM, Martínez GA, Civello PM.** 2009. Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Science***176**:749–757.
- Villareal NM, Bustamante CA, Civello PM, Matínez GA.** 2010. Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal Science Food Agriculture***90**: 683-689.
- Vincken JP, Schols HA, Oomen R, McCann MC, Ulvskov P, Voragen A, Visser R.** 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. implications for cell wall architecture. *Plant Physiology***132**: 1781–1789.
- Wada H, Shackel K, Matthews M.** 2008. Fruit ripening in *Vitis vinifera*: apoplastic solute accumulation accounts for pre-veraison turgor loss in berries. *Planta***227**: 1351-1361.
- Wada H, Matthews M, Shackel K.** 2009. Seasonal pattern of apoplastic solute accumulation and loss of cell turgor during ripening of *Vitis vinifera* fruit under field conditions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1773-1781.
- Wang SY, Lin HS.** 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:140-146.
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J.** 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature***410**: 380–383.
- Wang SY, Chen CT, Wang CY, Chen P.** 2007. Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *Journal of Agricultural Food Chemistry***55**: 8269–8274.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J.** 2008. An update on abscisic acid signalling in plants and more. *MolecularPlanta***1**: 198-217.
- Weebadde CK, Wang D, Finn CE, Lewers KS, Luby JJ, Bushakra J, Sjulín TM, Hancock JF.** 2008. Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. *Plant Breeding***127**: 94–101.
- Welander M., Zhu-Li H.** 2006. Rol genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses. *Plant Breeding Reviews***26**: 79–103.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N.** 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature***393**: 365–369.
- Winefield C, Lewis D, Arathoon S, Deroles S.** 1999. Alteration of *Petunia* plant form through the introduction of the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *MolecularBreeding***5**: 543–551.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Conner TW, Klee HJ.** 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology***27**: 1097-1108.
- Wisemann NJ, Turnbull CGN.** 1999. Endogenous gibberellin content does not correlate with photoperiod-induced growth changes in strawberry petioles. *Australian Journal of Plant Physiology***26**: 359–366.
- Woolley LC, James DJ, Manning K.** 2001. Purification and properties of an endo- β -1,4- glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cel1. *Planta***214**: 11–21.
- Woodward JR.** 1972. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture***23**: 465-473.

- Wrolstad RE, Shallenberger RS.**1981. Free sugars and sorbitol in fruits a compilation from the literature. *Journal of the Association Off. Analytical Chemistry***64**: 91-103.
- Wrolstad RE, Putnam TP, Varseveld GW.** 1970. Color quality of frozen strawberries: Effect of anthocyanin, pH, total acidity and ascorbic acid variability. *Journal Food Science***35**: 448–452.
- Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ.** 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low wáter potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology***111**: 765-772.
- Xie M1, Chen JW, Qin QP, Jiang GH, Sun CB, Zhang HQ, Xu HX.** 2007. The control of sugar accumulation within strawberry aggregate fruit by invertase and hexokinase. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*, **33**:213-218.
- Xu, W., H. Peng, T. Yang, B. Whitaker, L. Huang, J. Sun and P. Chen.** 2014. Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry***82**: 289-298.
- Xue S, Bors RH, Strelkov SE.** 2006. Resistance sources to *Xanthomonas fragariae* in nonoctoploid strawberry species. *HortScience***40**: 1653–1656.
- Yamashita I, Iino K, Nemoto Y, Yoshikawa S.** 1977. Studies on flavor development in strawberries. IV. Biosynthesis of volatile alcohol and esters from aldehyde during ripening. *Journal of Agricultural Food Chemistry***25**: 1165-1168.
- Yamasaki A, Yamashita, M.** 1993.Changes in endogenous cytokinins during flower induction of strawberry. *Acta Horticulturae***345**: 93-99
- Yaneff A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta LI, Amodeo G.** 2014. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences***111**, 231-236.
- Yarnell SH.** 1928. Notes on the somatic chromosomes of the seven-chromosome group of *Fragaria*. *Genetics***14**: 78–83.
- Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N, Muñoz-Blanco J, Caballero JL.** 2003. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *Journal of Experimental Botany***54**: 1865–1877.
- Zaharah SS, Singh Z, Symons GM, Reid JB.** 2011. Role of brassinosteroids, ethylene, abscisic acid, and indole-3-acetic acid in mango fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation***31**: 363-372.
- Zebrowska J, Hortynski J, Cholewa T, Honec K.** 2006. Resistance to *Verticillium dahliae* (Kleb.) in the strawberry breeding lines. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences***71**: 1031–1036.
- Zhang Y, Shih DS.**2007. Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Journal Plant Physiology***164**: 68–77.
- Zabetakis I, Holden MA.** 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *Journal Science Food Agriculture***74**: 421–434.
- Zorrilla-Fontanesi Y, Rambla JL, Cabeza A, Medina JJ, Sánchez-Sevilla JF, Valpuesta V, Botella MA, Granell A, Amaya I.** 2012. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-

methyltransferase *FaOMT* as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiology* **159**: 851-870.

Zuidmeer L, Salentijn E, Rivas MF, Mancebo EG, Asero R, Matos CI, Pelgrom KTB, Gilissen LJWJ, van Ree R. 2006. The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical & Experimental Allergy* **36**: 666–675.

Zuker A, Tzfira T, Scovel G, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Vainstein A. 2001. RolC transgenic carnation with improved horticultural traits: quantitative and qualitative analysis of greenhouse-grown plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 13–18.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

OBJECTIVES

The objectives of this thesis were the following:

- 1.- Functional characterization of strawberry *FaRGlyase1* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues, flowers and petals and under different experimental conditions to determine the behavior of its expression and hormonal regulation.
- 2.- Evaluation of transitory silencing of *FaRGlyase1* to determine the role played in the pectin metabolism and the cell wall middle lamellae degradation.
- 3.- Determination, using strawberry-segregating population, that *FaRGlyase1* is linked to a firmness quantitative trait locus (QTL).
- 4.- Functional characterization of strawberry *FaNIP1;1* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues, flowers and petals and under different experimental conditions to determine the behavior of its expression and hormonal regulation.
- 5.- Determination the capacity of water transport and solutes by the aquaporin *FaNIP1;1* using a heterologous system.
- 6.- Functional characterization of strawberry *FaDOF2* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues, flowers and petals and under different experimental conditions to determine the behavior of its expression and hormonal regulation.
- 7.- Determination *in vitro* of the binding affinity to *cis*-regulatory elements using a binding-protein microarray by the DOF transcription factor *FaDOF2* using a heterologous system.

8.- Evaluation of transitory silencing of *FaDOF2* to determine the regulatory role played as a transcription factor in the biosynthetic pathway of phenylpropanoid volatiles.

9.- Determination, by yeast two hybrid system, the interaction between FaDOF2 and the R2R3 MYB transcription factor, FaEOBII.

10.- Functional characterization of strawberry *FaBOP1* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues, flowers and petals and under different experimental conditions to determine the behavior of its expression and hormonal regulation.

11.- Evaluation of transitory silencing of *FaBOP1* to determine the regulatory role played as a transcriptional co-activator during the strawberry ripening.

12.- Evaluation of the processes affected by de silencing of *FaBOP1* by transcriptomic and metabolomic analysis of the transgenic fruits.

13.- Determination, by yeast two hybrid system, the interaction between FaBOP1 and the R2R3 MYB transcription factor, FaMYB10.

SUMMARY GENERAL METHODS

SUMMARY GENERAL METHODS

Plant material

Strawberry plants (*F. x ananassa* Duch. cv. Camarosa, an octoploid cultivar; *F. vesca*, *F. chiloensis* and *F. virginiana*) were grown under field conditions in Huelva (Spain). Fruits were harvested at different developmental stages: small-sized green fruit (G1, 2-3 g), full-sized green fruit (G3, 4-7 g), white fruit (W, 5-8 g), full-ripe red fruit (R, 6-10 g), overripe fruit (OR, 6-10 g) and senescent fruit (SN, 6-10 g). Selected OR fruits were harder and dark redder than the R ones, while SN fruits were softer. Vegetative tissues, such as runners, roots, crowns and expanding leaves, were also harvested. All tissues and fruit samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. These tissues were powdered under liquid nitrogen using a mortar and a pestle to isolate nucleic acids or to evaluate their hormone content levels. Strawberry plants (*F. x ananassa* Duch. cv. Elsanta) used for agroinfiltration were grown in a plant chamber at 25 °C, 10.000 lux and 80 % humidity and subsequently preserved in greenhouses. A cultivar collection and two breeding populations were grown under field conditions. Fruits of each line were collected at maturation stage and firmness of 5 full-ripe red fruits per line was measured by a non-destructive penetrometer (Durofel; InfoAgro. Madrid, Spain). *Nicotiana benthamiana* plants used for agroinfiltration were grown in a plant chamber at 25 °C, 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 80 % humidity and a photoperiod of 16 hours light and 8 hours dark.

Firmness was measured as a scale to reproduce the sensations felt when touching fruit, ranking from 20 (soft) to 80 (hard) in strawberries. Two seasonal measurements were taken as replicates. The mean and standard deviation were calculated for the two parents and the progenies and cultivar collection. Differences among progeny were tested through ANOVA.

Yeast and bacterial strains and growth conditions

Saccharomyces cerevisiae YSH1172 (*MATa leu2::hisG trp1::hisG his3::hisG ura3-52 aqy1Δ::kanMX4 aqy2Δ::HIS3*) was used in this work. Yeast strain was maintained in YPD medium (5 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 20 g.L⁻¹ glucose and 20 g.L⁻¹ agar).

Transformant strain was maintained and grown in a YNB medium without amino acids (DIFCO), with 20 g.L⁻¹ glucose or galactose and 20 g.L⁻¹ agar supplemented with the adequate requirements for prototrophic growth.

Escherichia coli DH5 α was used for routine propagation of plasmids. It was routinely maintained in a Luria-Bertani medium (LB) with ampicilin (100 mg.mL⁻¹) at 37 °C.

Analysis of nucleotide and deduced amino acid sequence of genes.

We used the resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda, MD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the European Bioinformatics Institute server (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>) for the *in silico* analysis of the gene sequence. In order to align the nucleotide sequence against databases, we used the NCBI BlastN program.

Multiple sequence alignment and the phylogenetic tree construction were performed with the EBI ClustalW2 program or the MegAlign program (from the Lasergene suite) as well as the FigTree program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>), respectively, using a bootstrap analysis with 1000 replicates. Prediction of domains and functional sites was performed with the InterPro database (version 4.8). The MEME program was used to identify conserved motifs and to validate the phylogenetic trees results. Default parameters were used with the following exception: the maximum numbers of motives to find was set to 10 and the minimum width was set to 8 amino-acid residues (Bailey et al., 2009) (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>).

Subcellular location was predicted by Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) and Wolfpsort (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html), and both pI and Mw were calculated using Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). BlastN has also been used to locate gene position in the *Fragaria vesca* genome in GDR databank (<http://www.rosaceae.org>). Phosphorylation sites were predicted using the NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk>).

Total anthocyanidin analysis

Anthocyanidin extraction was performed according to Medina-Puche et al. (2014). Anthocyanidin presence was measured at 515 nm. The amount of anthocyanins was calculated by using $E_{\text{molar}} = 36,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Woodward, 1972; Bustamante et al., 2009). Three replicates were performed per analysed treatment.

Determination of water content

The moisture content (MC) of fresh strawberry fruit was obtained from 10 fruit samples at different development stages (Green 1, Green 3, White, Red, Overripe) that were dried in a hot oven at 75 °C for 48 hours until the mass did not change between the two weighing intervals. It was performed three replicates for each analyzed fruit stage in order to obtain an average MC value for each sample.

Weight loss on drying to a constant final weight was recorded as moisture content based on the developed method AOAC (1984) and using the following equation: $MC = ((M_o - M_s)/M_o) \times 100$; where MC is moisture content, M_o is initial mass and M_s is the final mass of strawberry fruit (g).

Water stress treatment

Water stress treatments were carried out both *in planta* and in fruit detached of *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta plants. Whole treated plants were detracted of irrigation until the water content of the substrate decreased significantly (80% volumetric water content, VWC, in normal irrigation to 40% VWC in stress situation) and fruits showed the drought stress symptoms (darker and wrinkled ripen fruits as well as a increase in the ratio of dry and fresh weight of the fruit) (Figure S6), while control plants remained with normal irrigation. To determine the water content of the substrate a soil moisture data logger (Madgetech, SMR101A) in a weatherproof enclosure was used. It provides accurate volumetric water content measurements over a complete range from dry to saturated. The data were analyzed and processed using the MadgeTech 4 Data Logger Software.

For water stress treatment in detached fruits, strawberries at the Green-White stages were used in this experiment. Control fruits retained pedicels immersed in Murashige & Skoog medium (MS medium) with sucrose (renewed every two days), while fruits under water stress retained air pedicels without MS medium. The conditions of stress treatment and the samples analysis were performed following the instructions by Medina-Puche et al. (2014).

Strawberry cell culture and mannitol treatment

Mannitol is well known as inductor of the osmotic stress in plants besides, it is also involved in the induction of drought stress responsive genes (Katsuhara et al. 2014). In order to know if

FaNIP1;1 expression is reduced by osmotic stress, strawberry cell suspensions were treated with high concentration of mannitol. Thus, 500 mL of strawberry cells culture refreshed for five days was divided in two Erlenmeyer flask (Moyano-Cañete et al. 2013). Then, mannitol (200 mM) was added to a 250 mL Erlenmeyer and water was added to the other one for the control. Both control and mannitol cell cultures were incubated at 25 °C and 100 rpm under diffuse light. Cells were harvested by filtering after 2, 4, 6 and 24 hours. In all the cases, the harvested cells were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. The initiation of callus cultures and the cell suspension cultures were performed as described in Moyano-Cañete et al. (2013).

Auxin treatment

Achenes of two sets of 50 medium-sized green fruits (G3) were carefully removed from their receptacles using the tip of a scalpel blade. One set of de-achened G3 fruits was treated with a mix of lanolin paste (1 mL) containing 1mM of auxin 2,4-D and 1 % (w/v) DMSO. Another set of G3 de-achened fruits (control group) was treated with the same lanolin paste with DMSO but lacking 2,4-D. Both treatments were applied over the entire fruit surface. All fruits were harvested 5 days after treatment, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. During the course of the assays, the fruits reached the W developmental stage.

Nordihydroguaiaretic acid treatment

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) inhibitor, an enzyme required for ABA biosynthesis. Fruits at the G3-stage (still attached to the plants) were carefully injected with 0.5 ml of 100 µM NDGA sterile solution or sterile water (control fruits) using a hypodermic syringe. Treated fruits were harvested after 8 days of treatment, when they reached the R developmental stage, and were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. These samples were used for measurement of the ABA content and relative expression of gene.

ABA extraction procedure

Fruits from different strawberry developmental and ripening stages were pulverized in a mortar in the presence of liquid nitrogen. One gram of each powdered sample was placed in a 50 mL glass beaker and mixed with 1.26 nmol of internal standard (dABA) (40 µL of 31.5 nmol mL⁻¹ intermediate standard solution) for 5 min. Samples were extracted twice with 10 mL methanol/water pH 5.5 (1:1, v/v) and the mixtures centrifuged at 5000x g for 5 min at room temperature. Supernatants were extracted twice with 10 mL dichloromethane, extracts

centrifuged at 5000x *g* for 5 min at room temperature, and the lower phases evaporated under vacuum conditions at 40 °C. Residues were dissolved in 100 µL acetone 100 % and 250 µL water/acetonitrile (70:30, v/v) (0.1 % formic acid). Finally, samples were centrifuged at full speed for 5 min and the supernatants thereby generated were used for their ABA content analysis.

HPLC-MS conditions

In order to determine the ABA amount in strawberry fruits, we used an HPLC-MS system (VARIAN 1200L Triple Quadrupole) with a column (150 x 2.1 mm i.d. Phenomenex C₁₈ with 3 µm particle) (California, USA). The injection volume was 8 µL and the mobile phase used was A: water/0.1 % formic acid, and B: acetonitrile/methanol (75:25, v/v), with gradient program: t=0 min (95%5 A/B), t=2 min (65/35 A/B), t=10 min (0/100 A/B), and t=15 min (0/100 A/B), at a constant flow rate of 0.2 mL min⁻¹. The MS was operated in the negative Selecting Ion Monitoring (SIM mode). The source was operated with N₂ (LCMS quality) at 50 psi. MS parameters were optimized through a flow injection analysis (FIA) of the individual solutions of ABA and [²H₆]-ABA. These compounds gave a response in the SIM interface in the negative mode but not in the positive mode. The ESI needle voltage used amounted to -5.5 kV. Other optimized conditions for MS were: drying gas, 270 °C; source temperature, 55 °C; capillary voltage 45 V; shield voltage, 600 V. Detector voltage, 1500 V and dwelling times of 1s/scan were selected. Quadrupole one ion resolution was optimized at 0.5 Da. Work Station software (Varian, California, USA) was used to process the quantitative data obtained from calibration standards and plant samples.

Solid-phase micro extraction of eugenol

Eugenol was analysed in *Fragaria × ananassa* “Elsanta” fruits infiltrated with *A. tumefaciens* carrying pFRN or pFRN-*FaEOBII*, pK7WG2.0 or pK7WG2-*FaEOBII* and *Fragaria × ananassa* “Camarosa” and *Fragariavesca* fruits at different developmental stages. Ten strawberry fruits were harvested per sample and three samples were measured on each occasion. Fruits were ground to a fine powder under liquid nitrogen. 300 µl of saturated NaCl was added to 1 gram, 200 mg or 10 mg of powdered *F. × ananassa*, *F. vesca* white or red fruits, respectively. 3 ng of β-caryophyllene was added as an internal standard. Solid-phase micro extraction was performed on a 7890A GC- system (Agilent, <http://www.home.agilent.com/>) coupled to a 7200A QTOF-MS (Agilent). Samples were incubated for 10 minutes at 50°C, after which volatiles were extracted on a 100 µm PDMS fibre (Supelco, www.sigmaaldrich.com/Supelco) for 30 min at 50°C. Extracted compounds were desorbed for 1

min at 250°C in the injector port in splitless injection mode. Volatiles were separated on a HP5MS column (5% phenyl methyl silox, 30 m x 250 µm x 0.25 µm), with a constant helium flow of 1.2 mL/min. Oven temperature was set to 40°C for 3 min, ramped with 5°C/min until 250°C, and held at 250°C for 5 min. Twenty mass spectra were recorded every second (m/z 30-500) at an ionization energy of 70 eV. Eugenol was measured in commercial strawberry and no eugenol was detected above the detection limits of the system.

Therefore, a calibration curve of eugenol (Acros organics) carried out in extracts of these strawberries lacking eugenol was used to identify and quantify it. Statistical significance was tested with one-way ANOVA and a LSD post-hoc test or with a student's t-test using SPSS software.

Generation of a *FaRGlyase1* RNAi construct and transfection of strawberry fruit by agroinfiltration

A 475 bp non-conserved region of *FaRGlyase1* gene was cloned into the pFRN binary vector (courtesy of Dr. Marten Denekamp, Department of Molecular Cell Biology, University of Utrecht, The Netherlands) through the Gateway technology (Invitrogen, Darmstadt, Germany), to be used as a RNAi fragment in the silencing construct. The following forward primer 5'-GTA ACA GTC CGC TGG GAT ATG CAG-3' and reverse primer 5'-GTG AAG AAG TAA AAC GTG ATT GCC ATC TAA A-3' were used. The resulting fragment was cloned into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) and then transferred to the Gateway pFRN vector by way of a specific recombination of both plasmids using LR clonase (Invitrogen). The generated RNAi construct (pFRN-*FaRGlyase1*) was tested through sequencing and restriction analyses prior to strawberry plant transformation. The pFRN-*FaRGlyase1* construct generates RNAi which are directed against the endogenous *FaRGlyase1* gene.

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo et al., 1991) containing either the pFRN-*FaRGlyase1* or an empty pFRN was grown and independently injected into the base of whole strawberry fruits (cv. Elsanta) as described by Spolaore et al., (2001) and Hoffmann et al., (2006).

After 10 to 14 days, infiltrated fruits were harvested and analyzed by qRT-PCR. A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agroinjected fruits were inoculated and analyzed. Silencing extent was determined by comparing *FaRGlyase1* transcripts levels in pFRN-*FaRGlyase1* agroinjected fruits against those containing the treated empty pFRN vector.

Generation of *FaNCEDI*-RNAi constructs and transfection of strawberry fruits by agroinfiltration

The 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) cleaves C40-*cis*-epoxycarotenoids to produce xanthoxin, which is the direct precursor of ABA (Cutler and Krochko, 1999). Thus, the NCED enzyme catalyzes the key regulatory step in ABA biosynthesis (Kende and Zeevaart, 1997; Seo and Koshiba, 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005).

The *FaNCEDI* gene was cloned into pFRN binary vector (courtesy of Dr. Marten Denekamp from Department of Molecular Cell Biology, University of Utrecht, The Netherlands) using the Gateway technology (Invitrogen, Darmstadt, Germany). A 477-bp conserved region from the *FaNCEDI* (cv. Camarosa) was PCR-amplified to be used for the purposes of generating RNAi fragments in the silencing construct. The forward primer 5'- CGG TGC CGC CAG CTA CGC AT-3' and reverse primer 5'- GTG GGG GCC GCC AGA GGG AT-3' were used to that end. The resulting fragment was cloned into the pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) and subsequently transferred to the Gateway pFRN vector by specific recombination between both plasmids by using LR clonase (Invitrogen). The RNAi construct-generated (pFRN-*FaNCEDI*) was tested by sequencing and conducting restriction analyses prior to transformation of strawberry fruits. The pFRN-*FaNCEDI* construct generates RNAi directed against the endogenous *FaNCEDI* gene.

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo et al. 1991) containing the pFRN-*FaNCEDI* or empty pFRN vector was used to inject entire strawberry fruits (*Fragaria* × *ananassa* cv. Elsanta), in accordance with Hoffmann et al. (2006). A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agro-injected fruits were inoculated and analyzed, respectively.

Cloning of *FaNIP1;1* full-length cDNA in yeast plasmids and yeast transformation

The full-length cDNA of *FaNIP1;1* was amplified from total RNA of strawberry using specific primers 5'-GAG AAG GAT CCG CAG CCT TGA CCG TCT TCT G-3' and 5'-CCC TCG AAT TCG GTG AAG AGA AAC AAA GGG GTG A-3'. These oligonucleotides introduced a *Bam*HI and an *Eco*RI restriction site at the 5' and 3' ends of the *FaNIP1;1* PCR fragment, respectively. The PCR fragment obtained was separated by gel electrophoresis, purified using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) for sequencing. *FaNIP1;1* was excised by digestion with both *Bam*HI and *Eco*RI enzymes and cloned into the corresponding restriction sites of pYES2 (Invitrogen) previously digested with the same restriction enzymes. pYES2 plasmid is inducible by galactose and repressed by

glucose. Later, YSH1172 yeast strain was transformed by electroporation with the generated constructs (Faber et al. 1994).

Generation of FaDOF2-RNAi construct and silencing of FaDOF2 expression in strawberry receptacles by agroinfiltration

The *FaDOF2* gene was cloned into pFRN-RNAi binary vector (courtesy of Marten Denekamp from Department of Molecular Cell Biology, University of Utrecht, The Netherlands; Medina-Puche et al., 2014) using the Gateway technology (Invitrogen, Darmstadt, Germany). A 473-bp conserved region from the *FaDOF2* cDNA was PCR-amplified and used in the silencing construct (primers listed in Table S6, Supporting information). The resulting amplicon was cloned into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) and subsequently transferred to the Gateway pFRN vector using LR clonase (Invitrogen). The RNAi construct generated (pFRN-*FaDOF2*) was tested by sequencing prior to strawberry plant transformation. The protocol used to generate the *FaNCE1*-RNAi constructs was similar and is described in Medina-Puche et al. (2014).

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo et al., 1991), containing the pFRN-*FaDOF2* was used to inject the strawberry fruit receptacles (*Fragaria* × *ananassa* cv. Elsanta), according to Hoffmann et al. (2006). A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agroinfiltrated fruits were inoculated and analysed, respectively. As control, fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector were used.

Generation of FaBOPI-RNAi construct and transfection of strawberry fruit by agroinfiltration

The *FaBOPI* gene was cloned into pFRN binary vector (courtesy of Marten Denekamp from Department of Molecular Cell Biology, University of Utrecht, The Netherlands) using the Gateway technology (Invitrogen, Darmstadt, Germany). A 500-bp conserved region from the *FaBOPI* cDNA was PCR-amplified and used in the silencing construct, using *FaBOPI*-RNAi-fw and *FaBOPI*-RNAi-rv primers (Table S2, Supporting information). The resulting fragment was cloned into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) and subsequently transferred to the Gateway pFRN vector using LR clonase (Invitrogen). The RNAi construct generated (pFRN-*FaBOPI*) was tested by sequencing prior to strawberry plant transformation.

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo et al., 1991), containing the pFRN-*FaBOPI* was used to inject the receptacle of strawberry fruits (*Fragaria* × *ananassa* cv. Elsanta), according to (Hoffmann et al., 2006). A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agroinfiltrated fruits were

inoculated and analysed, respectively. As control, fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector were used.

Subcellular localization of FaNIP1;1

The construct used for transient gene expression and localization studies was derived from the binary vector pK7WGF2, which allows for the N-terminal fusion of the protein of choice with GFP (Karimi et al. 2002). The 819-bp CDS of the strawberry *FaNIP1;1* gene was amplified using primers 5'-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA ACA ATG GTT GAG AAA TAT GGT GAA AGT A-3' and 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA TAT GCG GTC GAC GCC TTT CAA G-3'. The PCR products were cloned into the entry vector pDONRTM221 (Invitrogen). The product was then transferred to the pK7WGF2 vector by LR recombination reaction (Invitrogen), resulting in a 35S::*GFP::FaNIP1;1* fusion construct. The generated construct was tested through sequencing prior to *Nicotiana* leaves transformation.

The *A. tumefaciens* strain GV3101 (Weigel and Glazebrook. 2006) containing either the pK7WGF2-*FaNIP1;1* or an empty pK7WGF2 for control plants, and *A. tumefaciens* strain GV3101 carrying the silencing suppressors genes vector pTBSV-p19 (Qiu et al. 2002), were grown at 28 °C in a LB medium with appropriate antibiotics. The p19 protein from TBSV was used to suppress gene silencing. The cells were harvested and re-suspended in an infiltration buffer (10 mM MgSO₄, 10 mM MES and 1mM acetosyringone). This step was repeated once and the concentration of bacterial suspension was measured by spectroscopy (OD₆₀₀) and adjusted to a final concentration of 0.5-0.8. Then, the cell carrying the pK7WGF2-*FaNIP1;1* and the empty pK7WGF2 constructs were mixed with the cell containing the p19 vector in pairwise, and left at room temperature for 2-4 h in darkness. The bacterial suspension was taken in a syringe without a needle and infiltrated through the abaxial surface of the leaf. Four days after, the localization of GFP-fused proteins was collected. To accurately locate nuclei, *N. benthamiana* leaf tissues were incubated with 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Leaves were observed by epifluorescence microscope LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss, Inc., Germany), with excitation/emission settings of 488/500–515 nm for GFP and 405/449–461 nm for DAPI.

Sub-cellular localization of FaNIP1;1 was also carried out by transient expression in onion epidermal cells by microparticle bombardment. The 35S::*GFP::FaNIP1;1* and 35S::*GFP* constructs, described above, were used for this purpose. Plasmid containing a plasma membrane marker (PM-rk CD3-1007) tagged to the mCherryFP was used for co-localization

experiments (Nelson et al., 2007). Freshly prepared onion epidermal peels were bombarded with gold particles (1 μm), coated with the proper DNA constructs, with a biolistic Helium gun device (DuPont PDS-1000; BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The expression of the fluorescent proteins in onion epidermal cells was observed after 48 h of incubation at 22°C in the dark (Barrero-Sicilia et al., 2011). Images were captured and examined in a confocal microscope (Leica SP8, Leica, Germany).

Cloning the full-length sequence of FaDOF2 and subcellular location of the protein coded

Constructs used for transient gene expression and localization studies were derived from binary vectors pK7WGF2,0 and pK7FWG2,0, which allow N- and C-terminal GFP fusion to FaDOF2 protein, respectively (Karimi et al, 2002). The 906-bp CDS of the strawberry *FaDOF2* gene was amplified (primers listed in Table S6, Supporting information) and cloned into entry vector pDONRTM221 (Invitrogen) using the BP recombination reaction (Invitrogen). Sequence verified full-length cDNA was subsequently transferred to the pK7WGF2,0 and pK7FWG2,0 vectors, using the LR recombination reaction (Invitrogen), resulting in 35S::GFP::FaDOF2 and 35S::FaDOF2::GFP fusions, respectively. Generated GFP constructs were tested through sequencing prior to *Nicotiana* leaves transformation.

The methodology used for agroinfiltration visualization and subcellular localization of the protein has been previously described (Medina-Puche et al, 2015; Molina-Hidalgo et al. 2015).

Cloning the full-length sequence of FaBOP1 and subcellular location analysis

The 1593-bp CDS of the strawberry *FaBOP1* was amplified from *Fragaria* \times *ananassa* cv Camarosa cDNA using the oligonucleotides *FaBOP1*-attB-fw and *FaBOP1*-attB-rv (Table S2, Supporting information), and cloned into the pDONRTM221 (Invitrogen) plasmid by the BP Gateway reaction (Invitrogen).

FaBOP1 was fused in frame with the green fluorescent protein (GFP) at N-terminal position by LR Gateway recombination (Invitrogen) in the destination vector pK7WGF2, resulting in 35S::GFP::FaBOP1 fusion. The generated GFP construct (pK7WGF2-FaBOP1) was tested through sequencing prior to *Nicotiana* leaves transformation.

The methodology used for the agroinfiltration visualization and subcellular localization of the protein has been previously described (Medina-Puche et al., 2015; Molina-Hidalgo et al., 2015).

Protein purification and determination of FaDOF2 DNA-binding specificity

Translational fusion of FaDOF2 fused to MBP was obtained by cloning its corresponding cDNA into the pMAL-c2 vector (New England Biolabs) by a GatewayTM LR reaction from pDONRTM221::FaDOF2. Recombinant insert was verified by sequencing and plasmid introduced into *E. coli* BL-21 strain. Expression and purification of recombinant protein was also described for the pMAL purification system (New England Biolabs). FaDOF2 DNA-binding specificity was determined using protein binding microarrays (PBM11) using soluble protein extracts from an induced *E. coli* culture, as described (Godoy et al., 2011; Franco-Zorrilla et al., 2014).

Yeast-two-hybrid interaction study of FaDOF2

For the yeast-two-hybrid studies, the ORFs of the *FaDOF2* and *FaEOBII* TFs genes described were recombined into the pBDGAL4 bait vector (pDESTTM32; InvitrogenTM) and pADGAL4 prey vector (pDESTTM22; InvitrogenTM) by a GatewayTM LR reaction. The resulting bait and prey vectors were transformed into yeast strains PJ69-4a (MATa) and PJ69-4 α (MAT α) (James et al., 1996), respectively, and used in yeast-two-hybrid experiments, as described by de Folter et al. (2005). Basically, yeast transformants were grown in appropriate selective liquid media (–Leu or –Trp) for 6 h, and cell density was adjusted to 3×10^7 cells mL⁻¹ (OD600 = 1). A 5- μ L sample of the cell suspensions was plated out on yeast synthetic dropout lacking Ade, His, Leu, and Trp, or His, Leu, and Trp, and supplemented with 5 mM 3-aminotriazole to test protein interaction. Plates were incubated at 28°C for 2 to 4 d. pDEST32-FabHLH3 and pDEST22-FaMYB9 were used as positive control (courtesy of Dr. Jan Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). Empty vectors pDEST22 or pDEST32 or pGADT7 gateway or pGBKT7 gateway were also cotransformed as negative controls. GenBank accession number for genes are FaEOBII, KM099230; FaMYB9, JQ989281; FabHLH3, JQ989284.

Yeast-two-hybrid interaction study of FaBOP1

For the yeast-two-hybrid studies, the ORFs of the *FaBOP1* and *FaMYB10* TFs genes described were recombined into the pBDGAL4 bait vector (pDESTTM32; InvitrogenTM) and pADGAL4 prey vector (pDESTTM22; InvitrogenTM) by a GatewayTM LR reaction.

Yeast strain PJ69-4a (MATa) cells was co-transformed with bait and prey constructs and screened on the SD-Trp-Leu medium at 28°C for 2 to 4 days. Five independent colonies with the same size were picked out and diluted into 100 μ l TE buffer, and aliquots of 10 μ l yeast cell

suspensions were dropped on selective medium SD-Trp-Leu-His supplemented with different concentrations of 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). Plates were incubated at 28°C for 2 to 4 d. As positive control, pDEST32-FabHLH3 and pDEST22-FaMYB9 were used (courtesy of Dr. Jan Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). The empty vectors pDEST22 or pDEST32 or pGADT7gateway or pGBKT7gateway were also cotransformed as negative controls. GenBank accession number for the genes are: FaMYB10, EU155162; FaMYB9, JQ989281; FabHLH3, JQ989284.

Genotype analysis

A preliminary genomic sequence of *F. x ananassa* was analyzed to find the genomic sequence around the gene and a SSR was detected using the Tandem Repeat Finder software (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). The design of primers flanking the SSR was made using primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>). Two different populations of cultivated strawberries and a cultivar collection were genotyped with SSR*FaRGLyase1* marker. DNA from 93 individuals of F2 Dover x Camarosa population, 93 individuals of F1 P03xP05 breeding population, and 48 lines of cultivar collection including parent of populations were extracted and amplified by PCR using SSR*FaRGLyase1* primers: forward 5'-TCT TGC ATG ACA ACC TTC AA-3' and reverse 5'-GGG AAT ATG TGG CTT TGA TTC-3'. SSR*FaRGLyase1* was mapped in F2 population Dover x Camarosa using JOINMAP software (van Ooijen, 2006). QTL QGene software (Joeannes and Nelson, 2008) was applied to firmness QTL analysis.

RNA isolation

Total RNA was isolated from independent pools of strawberry fruits at different growth and ripening stages and from vegetative tissues, in accordance with Asif *et al.*, (2000). Achenes were always removed from fruits and only receptacle RNA was extracted and purified. The total RNA obtained was treated with DNase I (RNase free) (InvitrogenTM), following manufacturer's instructions, and further purified using RNeasy Mini kit (Qiagen). RNA samples were considered DNA-free when no amplicons corresponding to the analysed genes were observed using RNA as template in a standard PCR reaction.

Microarray probe preparation, hybridization and statistical analysis

For transcriptomic studies we have used a custom made oligo based (60-mer) Agilent platform containing all the singletons corresponding to those sequences published in the strawberry genome project (<http://www.strawberry.org>). It has been demonstrated that the sequences of

ESTs from *Fragaria × ananassa* and *Fragaria vesca* presented a percentage of identity of 98.6% (Bombarely *et al.*,2010; Medina-Puche *et al.*,2014).

A previous study evaluated the relative sensitivity and specificity of different lengths of oligonucleotides from 20 mers to 60 mers. The conclusion of this study was that microarrays containing 60 mer probes represent a practical compromise between maximal sensitivity and specificity (Hughes *et al.*,2001). Furthermore, this 60 mers microarray platform provide superior signal-to-noise ratio and discrimination capacity (Mascarell-Creus *et al.*,2009).

The Agilent microarray contain a standard quality control grid constituted by ten different target oligonucleotides matching probes that are added to the samples at concentrations collectively spanning a million-fold range (the spike-in mixture). Relationship between spike-in concentration and signal intensity covers more than five orders of magnitude, with a total dynamic range of almost six orders of magnitude. This spike-in approach could be used as a means to measure and test the extent and linearity of the dynamic range with every sample run on the Agilent platform.

For microarray hybridization, 200 ng of total RNA of each samples was labelled using Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. Six hundred ng of Cy3-labeled aRNA was hybridized on an 8x60K Sure Print G3 custom microarray (Agilent Technologies).

The array was designed using eArray platform using the *Fragaria vesca* genome as a reference. After hybridization, arrays were washed according to the manufacturer's protocol. Arrays were scanned with an Agilent Microarray Scanner. Images and intensity data were obtained using Agilent Feature Extraction v.10.7 software. After hybridization and array scanning, images of the physical hybridization were visually inspected for artefacts such as scratches, bubbles, and high regional or overall background. Thus, the non-uniformities in a scanned image were determined as outliers and thus excluded from downstream analyses.

The microarray data were analyzed with the software for gene expression analysis Array Star 5 (DNASTAR). The raw expression intensities obtained from each one biological replica were normalized using the Robust Multichip Average (RMA). Moderated t-test and false discovery rate (FDR) (Benjamini and Hochberg, 1995), for multiple testing corrections were used with $p < 0.01$ to statistically identify significant differences.

Annotation of sequences from the EST library

The Blast2GO v 2.7.2 suite was used for functional annotation of the EST sequences using BLASTX with an expect value cutoff of 1.0E-10 and its own publicly available database dated on September 2013 (Conesa *et al.*, 2005). Only genes that were over- and under-expressed more than two-fold in the microarray analysis were used. GO data for each sequence was enriched using ANNEX (Annotation Augmentation) and those included in the InterPro database. Graphics from GO data were also obtained with this suite.

Validation of microarray data and expression analysis by quantitative real-time PCR

Expression analyses of genes herein analysed and studied in all physiological conditions were performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using a iCycler system (BioRad), as previously described (Benítez-Burraco *et al.*, 2003). First-strand cDNA was obtained from 2 µg total RNA using iScript kit (BioRad), following manufacturer instructions. Each reaction was performed, at least, in triplicate, and the corresponding C_t values were normalized using the C_t value corresponding to an interspacer 26S–18S strawberry RNA gene (Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Raab *et al.*, 2006; Encinas-Villarejo *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010, 2011; Cruz-Rus *et al.*, 2011; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). All these values were then used to determine the relative increase or decrease of gene expression in the samples as compared against those in control, in accordance with Pedersen (2001).

Interspacer 26S–18S gene (primers 5'- ACC GTT GAT TCG CAC AAT TGG TCA TCG -3' and 5'- TAC TGC GGG TCG GCA ATC GGA CG -3') was selected as control gene owing to its constitutive expression throughout all of the different tested experimental conditions. The efficiency of each particular qRT-PCR and the melting curves of the products were also analysed to ensure existence of a single amplification peak corresponding to a unique molecular species.

Anatomical sections of fruit parenchyma

Light microscopy

Tissue sections were prepared as follows: small portions of strawberry receptacle tissue were fixed in Bouin's fixative (75 % (v/v) saturated picric acid, 25 % (v/v) formaldehyde and 0.05 % (v/v) glacial acetic acid), dehydrated through an ethanol–tertiary butanol series and embedded in

“Paraplast Plus” (Sherwood Medical Co.). Sections of about 5 μm were cut with a microtome, mounted on slides coated with gelatin, deparaffinized in xylene and rehydrated through an ethanol series. For the purposes of a structural and histochemical analysis, some sections were stained with Periodic acid and Schiff’s reagent (PAS staining). Samples were covered with 0.5 % periodic acid for 2 h and, upon being washed in distilled water, were again covered with Schiff’s reagent for 3 h. Samples were subsequently washed in distilled water, dehydrated and mounted in “Entellan New” (EMD Biosciences). During staining, the periodic acid oxidizes carbohydrates creating aldehydes that react with the Schiff’s reagent to give a purple-magenta colour. PAS is a general procedure for staining carbohydrates.

Additionally, some sections were stained with 0.02 % ruthenium red dye in order to specifically stain pectins or with toluidine blue as a general staining. An Olympus AH-2 photomicroscope was utilized for sample visualization.

Electron microscopy

For electron microscopy purposes, small portions of strawberry receptacles tissue were fixed in 2 % glutaraldehyde in phosphate buffer pH 7.0. Samples were subsequently washed in distilled water, postfixed in aqueous 1 % (v/v) osmium tetroxide for 2 h at 4 °C and, after being washed in distilled water, stained with 3 % uranyl acetate for 2 h at room temperature in the dark. After dehydration with acetone, samples were embedded in Epon. The blocks and the resin were allowed to polymerize at 65 °C for 24 h. Silver sections of 70 nm were obtained in an ultramicrotome (Leica-Ultracut R) and mounted using nickel grids. Sections were stained with 3 % (v/v) aqueous uranyl acetate and lead citrate. Observations were conducted in a Philips CM-10 electron microscope.

Sections (800 nm thick) were also obtained from this material and subsequently stained with general dye toluidine blue (1 %) and borax solution (1 %) for 2 min. PAS and ruthenium red staining were also performed in a number of these sections but increasing the staining time to 4 days. Sections were then dehydrated, mounted and visualized.

Yeast growth assays under atypical substrates

To test the sensitivity/tolerance of YSH1172 yeast strain expressing strawberry *FaNIP1;1*, growth assays were performed under osmotic stress exerted by osmo-equivalent concentrations of KCl and sorbitol; the possible effect of atypical substrates (other than water) such as boron (boric acid), glycerol, and hydrogen peroxide (H_2O_2) was also evaluated. Growth assays were

performed on a solid YNB medium supplemented with 2 % (w/v) galactose with various concentrations of the above-mentioned substrates. Initially, strains were grown in a liquid YNB medium with orbital shaking at 28 °C up to $OD_{640nm} \approx 1.0$ corresponding to 1×10^7 cells/ml. Cells were centrifuged and washed in sterile distilled water. Multi-well plates were prepared with serial 10-fold dilutions of the original concentrated culture, and plates were inoculated with 3 μ l suspensions of yeast strains using a replica platter for 96-well plates device and incubated at 28 °C. Growth was recorded after 3 and 7 days. As for plates with hydrogen peroxide, boron and glycerol growth was recorded after one week.

Growth conditions and fluorophore loading for stopped-flow assays

YSH1172 yeast strain was grown in liquid YNB medium either with 2 % glucose or galactose with orbital shaking, at 28 °C up to $OD_{640nm} 1$, harvested by centrifugation (10000 x g; 3 min; 25 °C), re-suspended in a YPD medium (6 g.L⁻¹ wet weight) and incubated at 28 °C for 1 hour. Cells were then harvested by centrifugation (10,000 x g; 3 min; 4 °C), washed, and re-suspended in ice cold 1.4 M sorbitol (3 mL.g⁻¹ wet weight) and incubated at ice for 90 min.

The stopped-flow technique was used to monitor cell volume changes induced by osmotic shocks in cells loaded with a concentration-dependent self-quenching fluorophore (Soveral et al. 2007). To that end, cells were preloaded for 10 min at 30 °C with the nonfluorescent precursor 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA, 1 mM in an isosmotic solution), which is cleaved by nonspecific esterases generating the fluorescent form (CF) that remains mainly in the cytoplasm. As the cells shrink or swell in response to osmotic changes, the concentration of the entrapped fluorophore will rise or fall with a consequent change in fluorescence output. The concentration-dependent self-quenching properties of the fluorophore enable cell volume changes to be recorded as changes in fluorescence.

Evaluation of osmotic permeability coefficient (P_f) and activation energy (E_a) for water transport

Experiments were performed on a HI-TECH Scientific PQ/SF-53 stopped-flow apparatus, which has a 2-ms dead time, controlled temperature, interfaced with an IBM PC/AT compatible 80386 microcomputer. Five runs were usually stored and analysed in each experimental condition as described in (Soveral et al. 2007). In each run, 0.1 ml of cell suspension (initial osmolarity ($osm_{out}0=1.4M$) was mixed with an equal amount of hyperosmotic sorbitol solution to produce an inwardly directed gradient of impermeant solute (osmotic gradient 120 mOsmol) and water outflow. Fluorescence was excited using a 470 nm interference filter and detected using a 530

nm cut-off filter. The time course of volume change was followed by fluorescence quenching of the entrapped fluorophore (CF). The recorded fluorescence signals were fitted into a single exponential from which the rate constant (k) was calculated. Cell initial volumes (V_o) were obtained under a fluorescent microscope (Zeiss Axiovert, equipped with a digital camera) as previously described (Soveral et al. 2007).

The osmotic water permeability coefficient (P_f) was estimated from the linear relationship between P_f and k (Soveral et al. 2007), $P_f = k (V_o/A)(1/V_w (\text{osm}_{\text{out}})_\infty)$, where V_w is the molar volume of water, V_o/A is the initial volume to area ratio of the cell population, and $(\text{osm}_{\text{out}})_\infty$ is the final medium osmolarity after the osmotic shock. Activation energy (E_a) of water transport was evaluated from the slope of Arrhenius plots ($\ln P_f$ as a function of $1/T$), where T is temperature in Kelvin. Data are mean \pm SD of three independent experiments with at least five traces at each temperature.

Metabolic profiling

Strawberry FaBOP1-RNAi fruits were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Grinding was also performed under frozen conditions using liquid nitrogen. Fruit powder (50 mg) was extracted in 100% methanol following the methodology previously described (Roessner et al., 2001). Metabolite extractions, derivatization and gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (GC-TOF-MS) analyses were carried out as described previously (Lisec et al., 2006).

The GC-TOF-MS system was composed of a CTC CombiPAL autosampler, an Agilent 6890 N gas chromatograph and a LECO Pegasus III time-of-flight mass spectrometer running in EI+ mode. Metabolites were identified by comparison with database entries of authentic standards (Kopka et al., 2005; Schauer et al., 2005).

Before sample derivatization, and aliquot from the metabolite extraction described above was dried in the speed-vac (Thermo-Savant SVC 200H, Holbrook, NY, USA) and then resuspended in 150 μl of 80% methanol absolute ULC/MS (MeOH ULC) for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

LC-MS was performed on high-performance liquid chromatography (HPLC) system Surveyor (Thermo Finnigan, Bremen, Germany) coupled to Finnigan LTQ-XP system (Thermo Finnigan) as described previously (Tohge and Fernie, 2010). Metabolite data were normalized with respect to the mean response calculated for non-infected plants.

Statistical analysis of data

Statistical significance was tested with one-way ANOVA and a Scheffe post-hoc test or with a Student's *t*-test using SPSS software. Multivariate analysis was performed by Principal Component Analysis (PCA) analysis evaluating the number of significant components to be considered using the ggbiplot R package. To avoid the tendency of data scaling to amplify instrumental noise to which PCA is sensitive (Halouska and Powers, 2006), a method of scaling based upon Maximum Likelihood PCA (MLPCA) was used prior to multivariate analysis (Wentzell et al., 1997). Correlation analysis was performed and represented with the pheatmap R package.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

I.1. Material químico

I.1.1. Productos químicos

Todos los productos y reactivos utilizados fueron de alta calidad y se adquirieron en las casas comerciales que aparecen entre paréntesis:

A

Acetato amónico ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) (Sigma)

Acetato de litio (LiCH_3COO) (Sigma)

Acetato sódico (NaCH_3COO) (Merck)

Acetato potásico (KCH_3COO) (Merck)

Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (Merck)

Acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) (Merck)

Acetosiringona (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenona) ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$) (Aldrich)

Ácido abscísico ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$) (Sigma)

Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Panreac)

Ácido bórico (H_3BO_3) (Sigma)

Ácido clorhídrico (HCl) (Panreac)

Ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA) ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$) (Sigma)

Ácido etilen-diamino-tetraacético, sal disódica (EDTA- Na_2) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)

Ácido fórmico (CH_2O_2) (Merck)

Ácido indol-3-butírico (IBA) ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$) (Sigma)

Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES) ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$) (Sigma)

Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico (MOPS) ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$) (Sigma)

Ácido 1-naftalenacético (1-NAA) (Sigma)

Ácido nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) (Duchefa)

Ácido nítrico (HNO_3) (Merck)

Ácido nordihidroguaiarético (NDGA) ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$) (Sigma)

MATERIALES Y MÉTODOS

Ácido peryódico (H_5IO_6) (Panreac)
Ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) (Merck)
Ácido salicílico ($\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$) (Sigma)
Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Panreac)
ADN de esperma de salmón (sigma)
ADN de fago 1 digerido con *HindIII* (Pharmacia)
Agar (Promega)
Agar de plantas (Duchefa)
Agarosa (Promega)
Alcohol isoamílico ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{OH}$) (Sigma)
3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$) (Sigma)
Ampicilina sal sódica ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$) (Sigma)
Ascorbato sódico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$) (Sigma)
Adenosina 5'-trifosfato disódica (ATP) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$) (Sigma)
Azul de bromofenol ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$) (Sigma)
Azul de Coomassie G250 (Amersham)
Azul de Toluidina (Sigma)

B

Bacto-triptona (Difco)
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)
6-bencil aminopurina (BA) ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$) (Sigma)
Bicarbonato sódico (NaHCO_3) (Sigma)
Bis-Tris ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_5$) (Sigma)
Bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$) (Sigma)
Bromuro 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridio (Bromuro de etidio, BrEt) ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) (Sigma)
Butanol terciario (*tert*-Butanol) ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) (Merck)

C

Carbenicilina ($\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}$) (Duchefa)
Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Sigma)
Citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) (Panreac)
Cloranfenicol ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$) (Sigma)
Cloroformo (CHCl_3) (Merck)
Cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
Cloruro de litio (LiCl) (Merck)
Cloruro de magnesio (MgCl_2) (USB)
Cloruro potásico (KCl) (Merck)
Cloruro sódico (NaCl) (Panreac)
Cloruro de zinc (ZnCl_2) (Panreac)

D

Deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) (Pharmacia)
 Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Pharmacia)
 Deuteróxido de sodio (hidróxido de sodio deuterado)(NaOD) (Sigma)
 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) ($C_{16}H_{15}N_5 \times 2HCl$) (Sigma)
 Diclorometano (cloruro de metileno) (CH_2Cl_2) (Merck)
 Dietil pirocarbonato ($C_6H_{10}O_5$) (DEPC) (Sigma)
 N-N-dimetilformamida (C_3H_7NO) (Merck)
 Dimetil sulfóxido (DMSO) (C_2H_6SO) (Sigma)
 2,4-dinitrofenilhidrazina ($C_6H_6N_4O_4$) (Sigma)
 D-Luciferina ($C_{11}H_8N_2O_3S_2$) (Sigma)
 DNasa I RNasa free (InvitrogenTM)
 Ditiotreitól (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$) (Sigma)
 Dodecil sulfato sódico (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$) (Sigma)

E

EcoRI (NEB)
 Entellán (Merck)
 Espectinomicina diclorhidrato pentahidrato ($C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$) (Sigma)
 Estreptomycin sulfato ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) (Sigma)
 Etanol absoluto (CH_2OH) (Merck)
 Éter de petróleo ($(CH_3)_3COCH_3$) (Merck)
 Éter dietílico ($C_4H_{10}O$) (Merck)
 Etil acetato ($C_4H_{8O_2}$) (Sigma)
 Etilenglicol monobutil éter (2-BE) ($C_6H_{14}O_2$) (Sigma)
 Eugenol ($C_{10}H_{11}OH$) (Sigma)
 Extracto de levadura (Difco)

F

Fenol (C_6H_5OH) (Merck)
 Formaldehído (HCHO) (Merck)
 Fosfatasa alcalina de timo de ternera (CIAP)(InvitrogenTM)
 Fosfato monosódico diácido (NaH_2PO_4) (Panreac)
 Fosfato disódico monoácido (Na_2HPO_4) (Panreac)
 Fosfato sódico (Na_3PO_4) (Sigma)
 Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) (Sigma)

G

Gelatina (BioRad)
 Gentamicina sal de sulfato ($C_{21}H_{43}N_5O_7$) (Sigma)
 Glicerol ($C_3H_8O_3$) (Panreac)
 Glicina (H_2NCH_2COOH) (Merck)
 Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma)

MATERIALES Y MÉTODOS

Glutación reducido (Sigma)

GST-Sepharose (Novogen)

H

Hexadeciltrimetil-amonio bromido (CTAB) ($C_{19}H_{42}NBr$) (Sigma)

Hexano (C_6H_{14}) (Sigma)

Hidrolizado de caseína (NZ amina) (Sigma)

Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)

Hidróxido potásico (KOH) (Panreac)

I

Isoamil acetato ($C_8H_{14}O_2$) (Sigma)

Isopropanol (C_3H_7OH) (Merck)

Isopropil-b-D-tiogalactósido (IPTG) ($C_9H_{18}O_5S$) (Pharmacia)

K

Kanamicina monosulfato ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}H_2SO_4 \cdot H_2O$) (Duchefa)

Kinetina (6-furfuril-aminopurina) (Sigma)

L

Lanolina (Sigma)

L-Adenina (Sigma)

L-Arginina HCl (Sigma)

L-Fenilalanina (Sigma)

L-Histidina HCl Monohidrato (Sigma)

L-Isoleucina (Sigma)

L-Leucina (Sigma)

L-Lisina HCl (Sigma)

L-Metionina (Sigma)

L-Tirosina (Sigma)

L-Treonina (Sigma)

L-Triptófano (Sigma)

L-Valina (Sigma)

L-Uracilo (Sigma)

M

Maltosa ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) (USB)

Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™)

Marcador de peso molecular 100 pb (Pharmacia)

Marcador de proteínas (Broad Range 2-212 kDa) (BioLabs)

2-Mercaptoetanol (β -mercaptoetanol) (C_2H_6OS) (Sigma)

Metanol (CH_3OH) (Panreac)

4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido ($C_{16}H_{16}O_9$) (MUG) (Sigma)

Molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (Sigma)

Myo-inositol ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma)

N

Neoxantina

Nitrato amónico (NH_4NO_3) (Sigma)Nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)Nitrato potásico (KNO_3) (Panreac)**O** β -octil glucósido ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$) (Sigma)Óxido de deuterio (agua pesada) (D_2O) (Sigma)**P**

Parafina (Paraplast Plus; Sherwood Medical)

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Merck)Piridoxina (vitamina B6) ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Sigma)

Polietilenglicol 3350 (PEG-3350) (Panreac)

Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) (Panreac)

Progel Tris-Glycin 12% 1.0 mm (ANAMED)

1-Propanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) (Merck)**R**

Reactivo de Bradford ("Protein Assay") (BioRad)

Reactivo de Schiff (Na_2SO_3) (Merck)Rifampicina ($\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$) (Duchefa)RNasa OUTTM (InvitrogenTM)

RNasa pancreática (Pharmacia)

Roti Load (Roth)

SSacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (Sigma)Sepharose GST-BindTM Resin (Novogen)

Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma)

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Panreac)Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) (Sigma)Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Panreac)Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)

SYBR-Green I (Molecular Probes)

TTetrahidrato de cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)Tiamina (vitamina B1) ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \times \text{HCl}$) (Duchefa)Tricina ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$) (Sigma)

Titriplex (Merck)

Tris(hidroximetil)aminometano $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (Sigma)

Tritón X-100 (Sigma)

MATERIALES Y MÉTODOS

Tween-20 (poliexylen-sorbitan-monolaurato) (BioRad)

V

9-*cis*-violaxantina

X

*Xho*I (NEB)

Xilen-cianol FF (C₂₅H₂₇N₂O₆S₂Na) (Sigma)

Y

Yoduro potásico (KI) (Panreac)

Yoduro sódico (NaI) (Sigma)

Z

9-*cis*-zeaxantina

I.1.2. Antibióticos utilizados

Los antibióticos empleados fueron disueltos en agua destilada y esterilizados por filtración a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. Una vez esterilizados, se repartieron en alícuotas de 1 ml y se mantuvieron almacenados a -20 °C hasta su uso. La concentración de almacenamiento de los antibióticos se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1: Antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico	Solvente	Concentración de almacenamiento	Concentración final
Ampicilina (Sigma)	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamicina (Duchefa)	H ₂ O	50 mg/ml	50-100 µg/ml (microorganismos) 25-100 mg/l (plantas)
Rifampicina (Duchefa)	DMSO	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicilina (Duchefa)	H ₂ O	100 mg/ml	250-500 mg/l (plantas)
Cloranfenicol (Sigma)	EtOH	15 mg/ml	15 µg/ml
Estreptomina (Sigma)	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Espectinomicina (Sigma)	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Gentamicina (Sigma)	H ₂ O	15 mg/ml	15 µg/ml (bacterias) 10 µg/ml (levaduras)

I.1.3. Kits de biología molecular

*FavorPrep*TM *GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen)

Gateway[®] *BP Clonase*[®] *II Enzyme mix* (InvitrogenTM)

Gateway[®] *LR Clonase*[®] *Enzyme mix* (InvitrogenTM)

GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas)

GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
iProofTM High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)
iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad)
MarathonTM cDNA Amplification Kit (BD Biosciences)
One Library Efficiency DH5 α Chemically Competent Cells (InvitrogenTM)
One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli (InvitrogenTM)
pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega)
Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)
QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit (Qiagen)
QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen)
RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)
SsoAdvancedTM SYBR[®] Green SuperMix (Bio-Rad)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)

I.2. Material biológico

I.2.1. Material vegetal

Todo el material vegetal empleado procede de plantas de fresa (*Fragaria* \times *ananassa*) del cultivar Camarosa, recolectados en la Finca Experimental “El Cebollar” en Moguer, Huelva (CIFA, Junta de Andalucía). El material vegetativo utilizado para la experimentación fueron hojas, coronas, estolones y raíces. Las muestras biológicas se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Para la transformación por agroinfiltración (*Materiales y Métodos, Apartado II.10.4*) se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria* \times *ananassa*) del cultivar Elsanta y para los experimentos realizados para la determinación de ABA (*Materiales y Métodos, Apartado II.9.3*) se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria* \times *ananassa*) del cultivar Camarosa. Las plantas utilizadas se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y bajo una irradiancia de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ proporcionada por lámparas Osram Fuora (München, Germany).

Los estadios de desarrollo y maduración de los frutos se establecieron en función de los siguientes parámetros (Figura1):

- Verde-1 (V1): fruto pequeño con color verde en primera fase de crecimiento, con achenios muy juntos y verdes.

- Verde-2 (V2): fruto elongado con color verde, aquenios muy juntos y verdes.
- Verde-3 (V3): fruto verde de mayor tamaño, con aquenios separados y verdes.
- Blanco (B): fruto de color blanco que ha alcanzado su tamaño definitivo y con aquenios de color verde a marrón por los efectos de la lignificación.
- Intermedio (I): el fruto presenta zonas coloreadas que se extienden desde el extremo apical.
- Rojo (R): fruto completamente rojo y maduro y con aquenios lignificados.
- Sobremaduro (SM): fruto rojo intenso de textura blanda y aquenios rojos lignificados.
- Senescente (SN): fruto de color vino tinto, opaco, aquenios del mismo color.

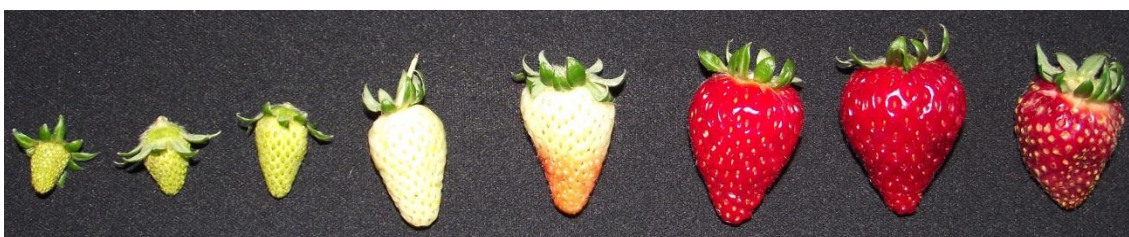


Figura1: Estadios de desarrollo y maduración del fruto de fresa (*Fragaria × ananassa* “Camarosa”)

I.2.1.1. Retirada de aquenios y tratamiento con auxinas

Con el objeto de determinar si los genes estudiados se encuentran regulados por auxinas, se procedió, sin separar el fruto de la planta madre, a la retirada cuidadosa de los aquenios en frutos de estadio de desarrollo V2 mediante un bisturí. Posteriormente, se aplicó sobre algunos de estos frutos desaquenizados una pasta de lanolina (preparada al 50% en H₂O y licuada a 65 °C) y, sobre otros frutos también desaquenizados, la misma pasta de lanolina conteniendo la hormona sintética ácido 1-naftalenacético (1-NAA) 2 mM, disuelta en DMSO al 2% (p/v). Ambos procesos se realizaron a temperatura ambiente. Los frutos tratados con lanolina más 1-NAA se recogieron después de 96 horas de la desaquenización y del tratamiento con la hormona. En todos los casos, los frutos tratados se congelaron inmediatamente después de su recolección en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

I.2.1.2. Frutos inyectados

Tratamiento con NDGA exógeno

Con el objetivo de bloquear la biosíntesis de ABA, se inyectaron frutos de fresa (*Fragaria × ananassa* “Elsanta”) en estadios verde-blanco con ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Creelman *et al.*, 1992). El NDGA es un inhibidor de la enzima 9-*cis*-

epoxycarotenoidedioxygenasa (NCED) que actúa bloqueando completamente la biosíntesis de ABA. Los frutos de fresa seleccionados para el experimento fueron inyectados con 1-2 ml de NDGA 100 μM , como previamente había sido descrito para tomate (Zhang *et al.*, 2009), o agua destilada (frutos control). Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones. Los frutos sometidos a tratamiento fueron cosechados tras 8 días de experimentación y empleados para la determinación de su contenido de ABA y la extracción de ARN. Para ello, los frutos recolectados fueron congelados con nitrógeno líquido inmediatamente y almacenados a -80°C hasta su uso.

I.2.1.3. Tratamiento de estrés hídrico

Para los experimentos de estrés hídrico, se emplearon tanto frutos de *Fragaria* \times *ananassa* “Elsanta” en estadio verde-blanco, como plantas completas de este mismo cultivar a las que se les retiró el riego.

Los frutos seleccionados para el experimento se mantuvieron con los pedicelos al aire mientras que los frutos control se mantuvieron con los pedicelos sumergidos en medio MS (Apéndice 19) enriquecido con sacarosa al 2%. En ambos casos, los pedicelos de los frutos fueron cortados diariamente para eliminar su extremo necrosado y facilitar la absorción del medio correspondiente. Tras cuatro días de tratamiento, los frutos fueron recolectados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta la extracción de su ARN.

En el caso del experimento con plantas completas, tanto las sometidas a estrés hídrico como las control se mantuvieron a una temperatura de 25°C , con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y bajo una irradiancia de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ proporcionada por lámparas Osram Fuora (München, Germany). A las plantas control se les mantuvo el riego diario mientras que a las plantas problema se les retiró hasta presentar un fenotipo claro de estrés hídrico. Llegado este momento se recolectaron frutos, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de su ARN.

I.2.2. Estirpes bacterianas

***Escherichia coli* DH5 α :** *F- supE44 DlacU169 (Φ 80lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Esta estirpe presenta varias mutaciones que favorecen la estabilidad del ADN clonado, se emplea generalmente para la replicación de plásmidos y la multiplicación de cósmidos. La delección *Φ 80lacZAM15* permite la α -complementación con el extremo

aminoterminal de la β -galactosidasa codificada por vectores del tipo pUC (entre ellos *pBluescript*) y pGEM[®]-T Easy.

***Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS** (Invitrogen[™]): *F*-, *ompT*, *hsdS* (*rB*-, *mB*-), *gal* (53, 54). Cepa deficiente en las proteasas *Lon* y *ompT*, con expresión nula de la proteína cuando no está inducida por IPTG y con expresión de la lisozima T7 que, entre otras cosas, facilita la rotura de las paredes celulares bacterianas en la extracción de proteínas. Resistente a Cloranfenicol (*Cam*).

***Escherichia coli* BL21 (TOP10)** (Invitrogen[™]): *F*- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacZ*74 *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*. Estirpe comercializada en forma de células químicamente competentes para la transformación con vectores plasmídicos de la tecnología Gateway (Invitrogen[™]). Permite la obtención de un ADN plasmídico de calidad ya que es una estirpe deficiente de la Endonucleasa I no específica (*endA1*) y deficiente en los sistemas de recombinación (*recA1*). Presenta una elevada eficiencia de transformación con ADN no metilado obtenido por PCR (*hsdRMS*).

***Agrobacterium tumefaciens* LBA4404** (Hoekema *et al.*, 1983): *TiAch5 Rif^r Str^r Thi⁺*. Estirpe bacteriana resistente a rifampicina y empleada para la transformación y obtención de plantas transgénicas de fresa. Contiene el plásmido *Ti* desarmado *pAL4404* que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina pero que no porta los genes de síntesis de opinas. No obstante, se mantiene intacta la región *vir* que aporta en trans las funciones de virulencia necesarias para la transferencia del T-DNA del vector binario correspondiente al genoma de la planta.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101** (Koncz y Schell, 1986): *pTiC58* Δ *T-DNA Rif^r Gent^r Kan^r*. Estirpe bacteriana resistente a rifampicina y empleada para la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Contiene el plásmido *Ti* desarmado *pMP90RK*, que confiere resistencia a gentamicina y kanamicina.

***Agrobacterium tumefaciens* AGL0** (Lazo *et al.*, 1991): *EHA101pTibO542* Δ *T-regionMop⁺*. Estirpe bacteriana resistente a rifampicina y empleada en la transformación y obtención de plantas transgénicas de fresa. Contiene el plásmido *Ti* desarmado *pTibO542* Δ *T* que posee una región correspondiente a los genes de síntesis de monopinas, y una región *vir* que aporta en trans las funciones de virulencia necesarias para la transferencia del T-DNA presente en un vector binario al genoma de la planta

I.2.2.1. Condiciones de cultivo de las estirpes bacterianas

Los cultivos líquidos de *E. coli* se crecieron siempre a 37 °C entre 12-14 horas, en agitación (150-200 rpm) y asegurando que la aireación del cultivo fuera la adecuada. Para ello, el volumen de medio utilizado nunca superó la quinta parte del volumen de aire del recipiente empleado. En el caso de *A. tumefaciens*, los cultivos líquidos se crecieron a 28 °C entre 18-48 horas dependiendo de la estirpe, en agitación (150-250 rpm) y asegurando, igualmente, una aireación elevada. En ambos casos, el medio de cultivo empleado fue LB suplementado con los antibióticos adecuados.

Apéndice 1: Composición de los medios de cultivo bacterianos

LB (Luria-Bertani) (Autoclave)

Bacto-triptona 10 g/l

Extracto de levadura 5 g/l

NaCl 10 g/l

H₂O destilada hasta alcanzar el volumen final. Ajustar a pH 7,5 con NaOH

LB sólido (Autoclave)

Medio LB

Agar 1,5% (p/v)

I.2.2.2. Conservación de las estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas se conservaron a -80 °C en el mismo medio nutritivo utilizado para su crecimiento suplementado con glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (v/v).

I.2.3. Estirpes de levaduras

Saccharomyces cerevisiae **PJ69-4a** (James *et al.*, 1996): *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 Δgal4 Δgal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ* (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding).

Saccharomyces cerevisiae **PJ69-4a**: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 Δgal4 Δgal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ* (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding).

Saccharomyces cerevisiae **YSH1172**: *MATa leu2::hisG trp1::hisG his3::hisG ura3-52 aqy1Δ::kanMX4 aqy2Δ::HIS3* (Cedido por la Dra. Catarina Prista, Lisboa, Universidad de Agronomía).

I.2.3.1 Condiciones de cultivo de las estirpes de levaduras

Los cultivos líquidos de levaduras se crecieron siempre a 30 °C entre 24-72 horas, en agitación (150-200 rpm) y asegurando que la aireación del cultivo fuera la adecuada. Para ello, el volumen de medio utilizado nunca superó la quinta parte del volumen de aire del recipiente empleado. El medio de cultivo empleado fue SDglu suplementado con los aminoácidos adecuados.

Apéndice 2: Composición de los medios de cultivo de levaduras

SD glu (Autoclave)

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 6,7 g/l
D-glucosa (Sigma) 20 g/l o Galactosa (Sigma) 20 g/l
H₂O destilada hasta alcanzar el volumen final.

SD glu sólido (Autoclave)

Medio SD glu
Agar 2% (p/v)

Apéndice 3: 10 x “Drop-out solution”

Compuesto	Peso (mg/l)	Referencia Sigma
L-Isoleucina	300	I 2752
L-Valina	1500	V 0500
L-Adenina	200	A 9126
L-Arginina HCl	200	A 5131
L-Histidina HCl Monohidrato	200	H 8125
L-Leucina	1000	L 8000
L-Lisina HCl	300	L 5626
L-Metionina	200	M 9625
L-Fenilalanina	500	P 2126
L-Treonina	2000	T 8625
L-Triptófano	200	T 0254
L-Tirosina	300	T 3754
L-Uracilo	200	U 0750

I.2.3.2 Conservación de las estirpes de levaduras

Las estirpes de levaduras empleadas se conservaron a -80 °C en el mismo medio nutritivo utilizado para su crecimiento suplementado con glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (v/v).

1.2.4. Vectores de clonación en *E. coli*.

pGEM[®]-T Easy (Promega). El vector pGEM[®]-T Easy (Figura 2) se utilizó para la clonación de fragmentos de ADN amplificados mediante PCR. Es un plásmido de alto número de copias que se comercializa en forma linealizada después de haber sido digerido enzimáticamente mediante la endonucleasa de restricción *EcoRV*. Además, la posición 3' de los extremos romos resultantes de la actuación de la restrictasa han sido modificados químicamente adicionando dos restos de deositimidina. Estos residuos incrementan la eficiencia de la ligación de los productos de PCR debido a que numerosas ADN polimerasas termoestables añaden sistemáticamente un residuo de deosiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados, independientemente de la secuencia del ADN utilizado como molde.

El sitio de inserción se encuentra flanqueado por un lugar de clonación múltiple que contiene dianas únicas para 12 endonucleasas de restricción diferentes y puntos de corte duplicados, a ambos lados del lugar de inserción, para tres restrictasas distintas. En los extremos del mismo, aparecen cuatro secuencias promotoras diferentes (cebadores *Reverse (M13)*, *Forward (M13)*, *T3* y *T7*). El sitio de clonación múltiple interrumpe la secuencia génica del fragmento aminoterminal α de la β -galactosidasa susceptible de ser α -complementado por el fragmento ω existente en el genoma de la célula hospedadora, lo que facilita la selección de recombinantes mediante IPTG y X-Gal. Además, el plásmido pGEM[®]-T Easy confiere resistencia al antibiótico ampicilina a las células bacterianas que lo contienen.

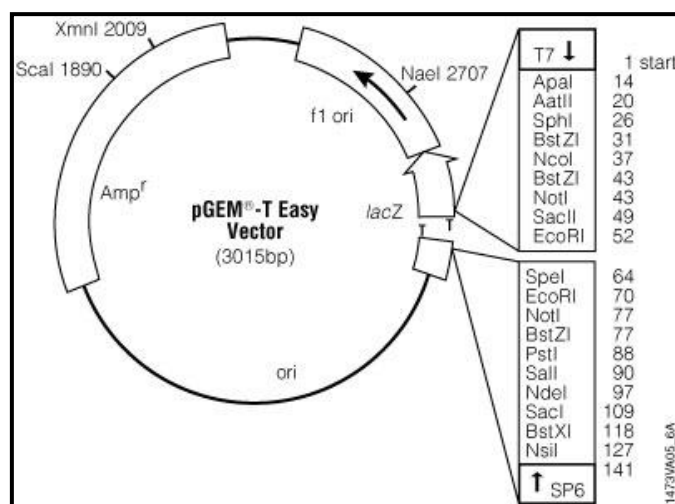


Figura 2: Vector de clonación pGEM[®]-T Easy

pCR[®]8/GW/TOPO[®] (*Gateway[®] Vector*, Invitrogen[™]). Este vector (Figura 3A) se empleó para el subclonaje de fragmentos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR). Se comercializa en forma linealizada con extremos protuberantes 3' de timidina unida covalentemente a Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* (Shuman, 1991). La unión de la topoisomerasa al ADN es eliminada durante el subclonaje de cualquier producto de PCR que presente un residuo de deosiadenosina en su extremo 3' adicionado por la acción inespecífica de la *Taq* polimerasa durante la obtención del amplicón. La presencia de estos residuos aumenta la eficiencia de subclonaje en el vector plasmídico.

Junto al sitio de subclonaje del producto de PCR en el plásmido, existen los sitios *attL* Gateway® (Invitrogen™). Ello permite que el vector pCR®8/GW/TOPO® pueda ser empleado como un *Entry vector* en el sistema de subclonaje Gateway® (Invitrogen™) (Figura 3A). El sistema Gateway es una metodología de clonaje universal que emplea el sistema de recombinación específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989). De este modo, el fragmento de ADN subclonado en este vector puede ser transferido eficazmente mediante recombinación a otro vector que contenga los sitios *attR* Gateway® (Invitrogen™). El fragmento subclonado en este vector puede ser secuenciado empleando los cebadores universales *Forward* (M13) y *Reverse* (M13); o escindido mediante digestión enzimática con *EcoRI*. Además, este vector confiere resistencia a espectinomicina a las células bacterianas que lo contienen.

pDONR™221 (Gateway® Vector, Invitrogen™). Este vector (Figura 3B) se empleó para la clonación de fragmentos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Está diseñado para generar sitios *attL* que flanqueen al producto de PCR subclonado dentro de él y así poder ser empleado posteriormente como *Entry vector* en la recombinación basada en la metodología Gateway®. El fragmento clonado en este vector puede ser secuenciado empleando los cebadores universales *Forward* (M13) y *Reverse* (M13). Además, este vector confiere resistencia a kanamicina a las células bacterianas que lo contienen.

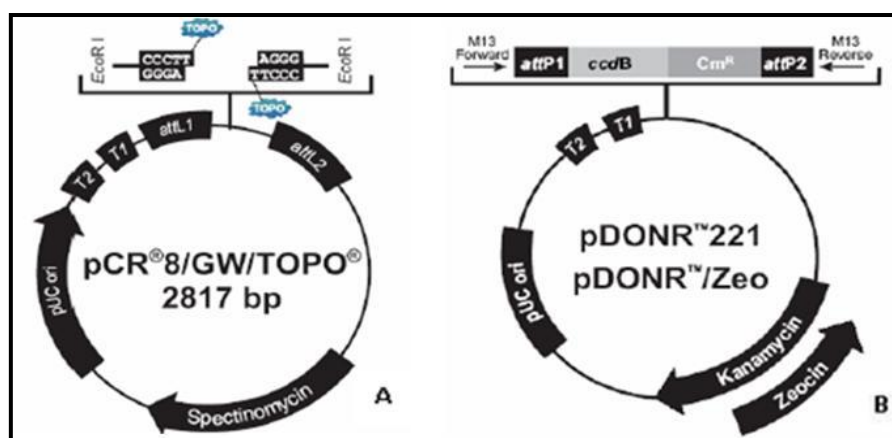


Figura 3: A) Vector de clonación pCR®8/GW/TOPO®. B) Vector de clonación pDONR™221

En cualquier caso, las construcciones pGEX-4T-1-ADN_c obtenidas se transforman preferentemente en la estirpe bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, resistente a cloranfenicol (Cam). Además, la selección de células de *E. coli* portadoras de este vector se hace en presencia de ampicilina. Por otra parte, para el análisis mediante PCR de los clones de interés se emplean los cebadores pGEX 5' y pGEX 3' (Tabla 2).

pDEST-TH1 (Cedido por el Dr. José Manuel Franco, Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC) (Figura 5). Es un vector de expresión de proteínas en bacterias que se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway*[®] (Invitrogen[™]). La expresión de la proteína está bajo control del promotor *lac* que se induce en presencia del análogo de la lactosa isopropyl β -D-thiogalactosido (IPTG).

Este vector es una modificación del vector pMal-p2X en el que se han introducido los sitios de recombinación *attR* y el gen *ccdB* situado en la región delimitada por dichos extremos (*attR1-ccdB-Cm^R-attR2*). Además, contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol junto al gen *ccdB*, por lo que la presencia de este antibiótico en el medio favorece la estabilidad del gen *ccdB* en el ADN plasmídico. Para la selección en células de *E. coli*, este vector contiene además un gen marcador de resistencia al antibiótico ampicilina. Este vector contiene además el gen de fusión de unión a la maltosa (*MBP*) en el extremo amino terminal del gen de interés, que lo convierte en un sistema muy versátil de expresión, purificación y detección de proteínas producidas en *E. coli*.

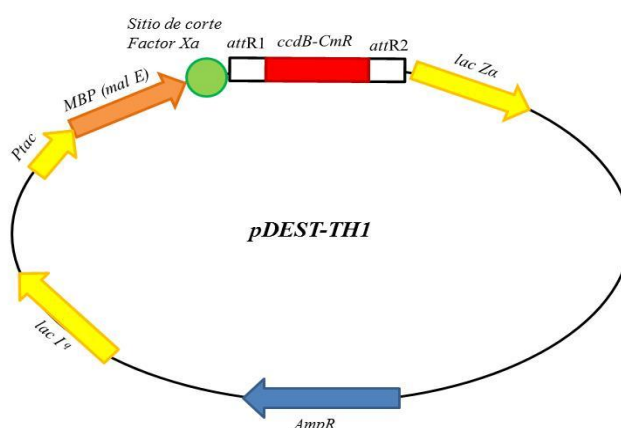


Figura 5: Vector de expresión pDEST-TH1

El sistema se basa en la expresión inducible de altos niveles de proteína recombinante fusionada a la MBP en el extremo amino terminal. Posteriormente, la proteína de fusión obtenida se purifica a partir de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa, lo que nos permite la captura específica de la proteína y la eliminación de impurezas

presentes en la muestra mediante varios lavados sucesivos. Este proceso de purificación preserva tanto la antigenicidad como la actividad de la proteína lo que facilita su posterior análisis. Si es necesario, la MBP se puede eliminar mediante digestión con la proteasa Factor Xa y liberar así la proteína recombinante de interés para usos posteriores.

pDESTTM22 (*Gateway[®] Vector*, InvitrogenTM) (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding) (Figura 6). Es un vector de expresión de proteínas en levaduras que se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway[®]* (InvitrogenTM). La secuencia completa de ADNc de los genes a estudiar mediante el doble híbrido en levaduras se transfiere desde el vector pDONRTM221 mediante una reacción de recombinación mediada por la enzima *LR clonasa*, generando un vector AD-Y. El gen de interés queda fusionado en el mismo marco de lectura al dominio de activación de la transcripción (AD) de la proteína GAL4. En el sistema del doble híbrido de levadura, este vector es empleado para escrutar interacciones entre proteínas. Este vector posee el gen *ccdB* situado en la región delimitada por los extremos *attR* (*attR1-ccdB-Cm^R-attR2*) asociado al gen marcador de resistencia a cloranfenicol.

Para la selección en células de *E.coli*, este vector contiene además un gen marcador de resistencia a ampicilina. Para la selección en levaduras *S. cerevisiae* cepa PJ69-4a, contiene un gen marcador de selección al triptófano.

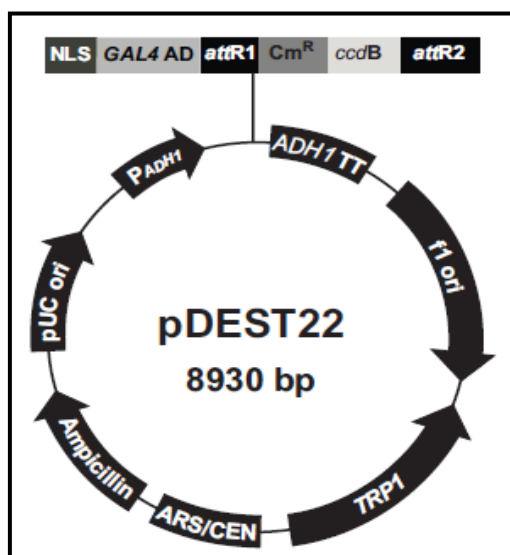


Figura 6: Vector pDESTTM22

pDESTTM32 (*Gateway[®] Vector*, InvitrogenTM) (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding) (Figura 7). Es un vector de expresión de proteínas en levaduras que se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway[®]* (InvitrogenTM). La secuencia completa de

ADNc de los genes a estudiar mediante el doble híbrido en levaduras se transfiere desde el vector pDONRTM221 mediante una reacción de recombinación mediada por la enzima *LR clonasa*, generando un vector BD-X. El gen de interés queda fusionado en el mismo marco de lectura al dominio de unión al ADN (BD) de la proteína GAL4. En el sistema del doble híbrido de levadura, este vector es empleado para escrutar interacciones entre proteínas.

Este vector posee el gen *ccdB* situado en la región delimitada por los extremos *attR* (*attR1-ccdB-Cm^R-attR2*) asociado al gen marcador de resistencia a cloranfenicol.

Para la selección en células de *E.coli*, este vector contiene además un gen marcador de resistencia a gentamicina y un gen marcador de selección a la leucina para la selección en levaduras *S. cerevisiae* cepa PJ69-4a.

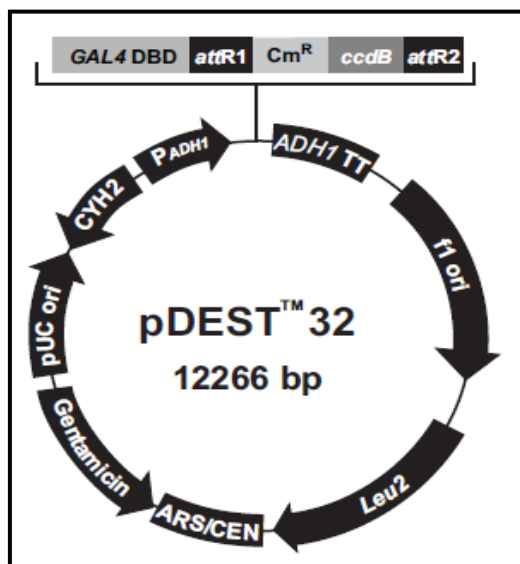


Figura 7: Vector pDESTTM32

I.2.6. Vectores binarios

pFRN (Cedido por el Dr. Marten Denekamp del Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Utrecht, Países Bajos). Este es un vector binario que se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway*[®](InvitrogenTM) (Figura 8). Se utiliza en la transformación de plantas ya que produce moléculas de ARN interferente (ARNi) en las plantas transgénicas resultantes, lo que conlleva al silenciamiento génico postranscripcional de los genes clonados.

Este vector es una modificación del vector pFGC5941 (ChromDB) en el que se ha sustituido el gen *bar* que confiere resistencia a basta, por el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina en la planta transgénica que lo contiene. Posee además cuatro sitios *attR Gateway* en posiciones invertidas (*attR1-attR2* y *attR2-attR1*), de manera que el inserto es subclonado en orientación antisentido y sentido simultáneamente. De este modo, se produce la formación de moléculas de ARN de doble cadena (ARNds) desencadenantes del silenciamiento génico por ARNi. Entre las dos regiones *attR Gateway*[®] y separándolas entre sí, se encuentra la secuencia correspondiente al intrón del gen *ChsA* (gen que codifica una chalcona sintasa) y que da lugar a un bucle en la estructura secundaria del ARNds, necesario para la formación del ARNi. La síntesis del ARNds está dirigida por el promotor 35s CaMV y OCS 3' es terminador de la transcripción de dicho promotor. La región situada entre los extremos LB (borde izquierdo) y RB (borde derecho) es transferida al genoma de la planta durante la transformación mediada por *Agrobacterium*.

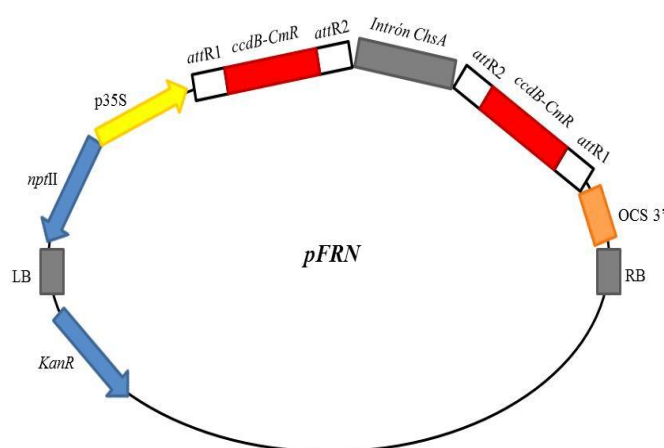


Figura 8: Estructura del vector binario pFRN empleado para el silenciamiento génico postranscripcional mediante ARNi en plantas transgénicas de fresa.

Este vector incluye además dos genes *ccdB* flanqueados por cada pareja de extremos *attR* (*attR1-ccdB-CmR-attR2* y *attR2-ccdB-CmR-attR1*) (Bernard y Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1993). La proteína codificada por este gen interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de estirpes de *E. coli* (ej. DH5 α y TOP10). Por ello, se almacena en la estirpe de *E. coli* DB3.1 que contiene la mutación (*gyrA462*) que la hace insensible a los efectos de la proteína CcdB. De esta manera, este gen permite la selección negativa de las células que lo contienen tras el proceso de recombinación con la *LR* clonasa *Gateway*[®] (*Materiales y Métodos*, apartado II.10). Además, contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol junto al gen *ccdB*, por lo que la presencia de este antibiótico en el medio favorece la estabilidad

del gen *ccdB* en el ADN plasmídico. Para la selección en bacterias y plantas, este vector contiene además un gen marcador de resistencia al antibiótico kanamicina.

pK7WGF2.0 (Plant Systems Biology, VIB) (Karimi *et al.*, 2002) (Figura 9). Este vector binario se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway*[®](Invitrogen[™]). Se utiliza en la transformación de plantas para la sobreexpresión de genes de interés dirigida por el promotor 35S, además posee un gen reportero de fluorescencia (*Egfp*) situado a continuación del promotor 35S y fusionado en el mismo marco de lectura que nuestro gen de interés en su extremo amino-terminal. Este vector, como todos los que utilizan la tecnología *Gateway*, posee los sitios de recombinación *attR* específicos para clonar fragmentos de ADN en una reacción *in vitro* de la *LR clonase*[™], de manera eficiente y específica. Los fragmentos se clonan en una orientación dirigida y marco de lectura predefinido. Además, posee el gen *ccdB* situado en la región delimitada por los extremos *attR* (*attR1-ccdB-Cm^R-attR2*) cuyas características se han explicado anteriormente.

Para su selección en bacterias y plantas, este vector contiene además un gen marcador de resistencia a espectinomicina/estreptomicina y a kanamicina respectivamente

Este vector se empleó para estudios de localización subcelular de los genes *FaNIP1;1*, *FaDOF2*, y *FaBOP1*, mediante su expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

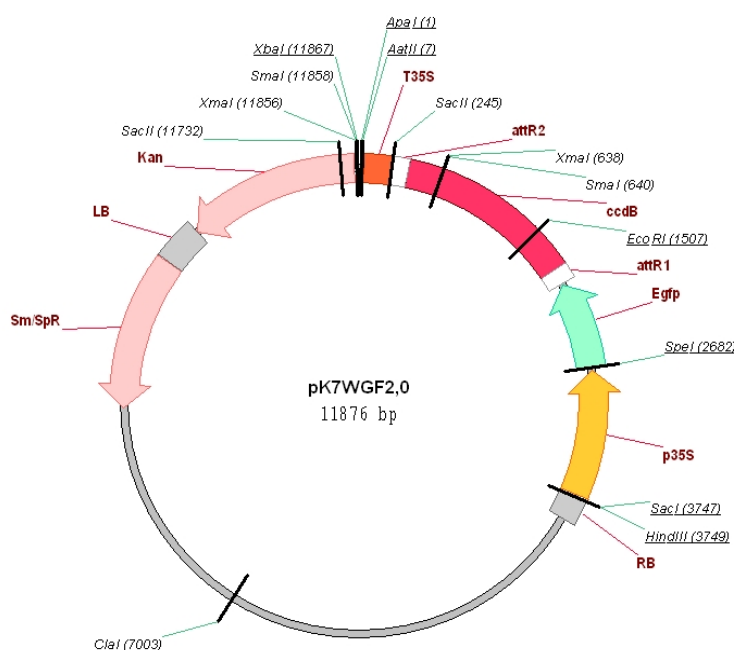


Figura 9: Vector de expresión pK7WGF2.0

pYES2 (Invitrogen) (Figura 10). Este vector de 5.9 kb está diseñado para la expresión de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. Las características del vector permiten un fácil clonaje del gen de interés y la selección de los transformantes a través de la prototrofia por uracilo. El vector contiene el promotor *GAL1* inducible por galactosa y reprimible por glucosa, para la expresión de altos niveles de proteína en la levadura. Un sitio de clonaje múltiple. El terminador de la transcripción *CYC1*, el gen *URA3* para selección de los transformantes en la cepa de levadura huésped con genotipo *ura3* y el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*.

Este vector se empleó para los estudios de sobreexpresión de la proteína FaNIP1;1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

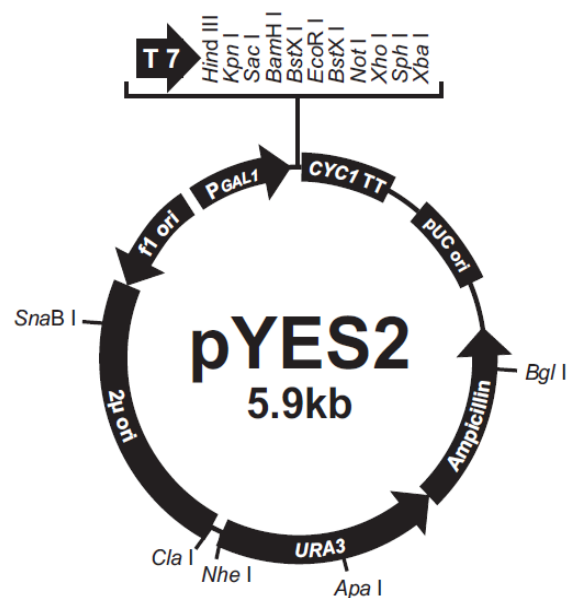


Figura 10. Vector de expresión pYES2

pUG35 (Drs. U. Güldener y J. H. Hegemann, Heinrich-Heine-Universität, Institut für Mikrobiologie, Düsseldorf, Alemania) (Figura 11). Este vector de 6.2 kb está diseñado para la expresión de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*, fusionadas al gen *Efgp3* de la medusa *Aequorea victoria* en el extremo C-terminal. Las características del vector permiten un fácil clonaje del gen de interés y la selección de los transformantes a través de la prototrofia por uracilo. El vector contiene un promotor reprimible por metionina, para la regulación de la expresión de proteínas en la levadura. Un sitio de clonaje múltiple. El gen *URA3* para selección de los transformantes en la cepa de levadura huésped con genotipo *ura3* y el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*.

Este vector se empleó para los estudios de sobreexpresión de la proteína FaNIP1;1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

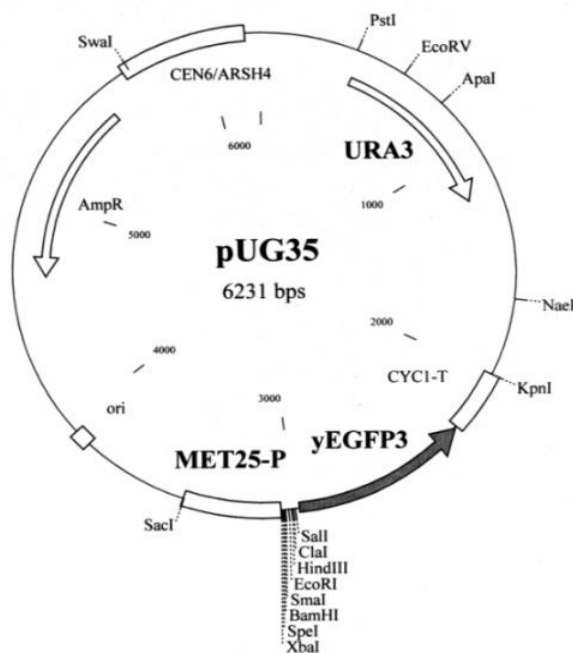


Figura 11. Vector de expresión *pUG35*

II. MÉTODOS

II.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

II.1.1. Extracción de ARN

II.1.1.1. Tratamiento del material y soluciones utilizadas en la extracción de ARN

El material de vidrio utilizado en la extracción de ARN fue cuidadosamente lavado con agua bidestilada y esterilizado mediante su calentamiento a 180 °C en un horno durante un periodo de cinco a seis horas. El material plástico no desechable, como las cubetas de electroforesis, se trató por inmersión en solución alcalina de NaOH 50 mM durante un periodo de entre tres y doce horas, lavándose seguidamente con agua bidestilada. El resto del material fue esterilizado a 121 °C durante 20 minutos en autoclave.

Las soluciones acuosas fueron tratadas con DEPC a una concentración final de 0,1% (v/v). Tras una agitación vigorosa, se dejaron reposar en una campana de extracción de gases durante 16 horas y posteriormente se esterizaron en autoclave. Los tampones que contenían Tris en su composición fueron preparados con agua estéril previamente tratada con DEPC y posteriormente se esterizaron de nuevo. El DEPC es una sustancia tóxica y un potente inhibidor de las RNAsas, no obstante, a las condiciones de presión y temperatura que se alcanzan durante la esterilización en autoclave, éste se descompone en CO₂ y CH₂OH.

II.1.1.2. Obtención y purificación de ARN

II.1.1.2.1. Preparación de solventes orgánicos

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1; v/v)

Se empleó para eliminar proteínas presentes en las muestras de ácidos nucleicos. El cloroformo desnaturaliza las sustancias proteicas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica. El alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante el proceso de extracción. Se mezcló un volumen de fenol neutro con un volumen de una mezcla 24:1 de cloroformo: alcohol isoamílico. La mezcla se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

II.1.1.2.2. Método de purificación de ARN empleando cloroformo: isoamilalcohol

La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en Asif *et al* (2000). El tejido congelado (1g) se homogenizó en presencia de N₂ líquido. El polvo obtenido se transfirió a un tubo Beckman estéril de 50 ml que contenía 10 ml de tampón de extracción precalentado a 65 °C y se incubó a esa misma temperatura durante 1 hora con agitación ocasional. Tras la incubación, el tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Dicha mezcla se agitó vigorosamente hasta la aparición de una única fase, y posteriormente se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se repitió el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico como anteriormente. Finalmente, la fase acuosa recuperada se trasvasó a un tubo nuevo, se añadió LiCl hasta una concentración de 3 M, y se incubó durante 16 horas a 4 °C. El ARN se recuperó mediante centrifugación durante 30 minutos a 17.000 g y 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 200 µl de H₂O-DEPC y se lavó con fenol, fenol: cloroformo (1:1) y cloroformo secuencialmente. Para precipitar los polisacáridos presentes, se procedió de la siguiente forma: a la fase acuosa obtenida se le añadieron 1/30 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 0,1 volúmenes de etanol. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 4 °C en una microfuga a máxima velocidad. Por

último, el ARN se precipitó con acetato sódico 0,3 M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol. La mezcla se incubó durante 3 horas a -80 °C, y posteriormente el ARN se recuperó mediante centrifugación a 14.000 g durante 45 minutos a 4 °C. El ARN obtenido se lavó sucesivamente con 1 ml de etanol 70% y 100%, y finalmente se resuspendió en 100 µl de H₂O-DEPC. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1*). El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Apéndice 4: Soluciones utilizadas para la obtención y purificación de ARN

Tampón de extracción cloroformo:alcoholisoamílico (aptdo. II.1.1.2.2.)

Tris-HCl pH 8,2 100 mM
EDTA-Na₂ pH 8 20 mM
NaCl 1,4 M
CTAB 2 % (p/v)
β-mercaptoetanol 1 % (v/v)

II.1.2. Extracción de ADN

II.1.2.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico

Las extracciones rutinarias de ADN plasmídico se realizaron siempre empleando *kits* comerciales especialmente diseñados para la purificación de pequeñas cantidades de ADN(miniprep). Cuando la cantidad de ADN plasmídico requerido para experimentación fue mayor, se emplearon otros *kits* comerciales diseñados para mejorar el rendimiento del ADN obtenido basándose, principalmente, en un aumento del volumen de partida del cultivo en cuestión (midiprep). Siempre se siguieron los protocolos suministrados por las casas comerciales. La integridad del ADN obtenido fue comprobada mediante electroforesis de una parte alícuota de la muestra (*Materiales y Métodos, apartado II.2.2.1*).

II.2. Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos mediante electroforesis

II.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos se determinó mediante espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260 nm y considerando un coeficiente de extinción para el ADN bicatenario de 50 µg⁻¹cm⁻¹ml y para el ARN de 40 µg⁻¹cm⁻¹ml. Generalmente, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop (*ND-100 Spectrophotometer*).

En el caso de muestras de ARN, paralelamente se realizaron medidas a 230 y 280 nm para determinar el grado de contaminación de la muestra por polisacáridos y proteínas respectivamente. La relación Abs_{260nm}/Abs_{230nm} nos indica la presencia de polisacáridos frente a ácidos nucleicos y su valor recomendado es ~ 2 . La relación Abs_{260nm}/Abs_{280nm} indica la presencia de proteínas frente a ácidos nucleicos y su valor recomendado es también ~ 2 . Fue absolutamente imprescindible tener en cuenta estos valores en experimentos de RT-PCR para que las muestras de ARN empleadas fueran retrotranscritibles.

De forma más grosera, la concentración de ácidos nucleicos también se estimó por comparación visual de una parte alícuota de la muestra problema frente a un patrón de ADN de concentración conocida (ADN de fago λ digerido con *HindIII*, Pharmacia) separadas electroforéticamente de forma simultánea. Este sistema también nos permitió determinar el grado de pureza de las muestras analizadas.

II.2.2. Separación electroforética de ácidos nucleicos

II.2.2.1. Electroforesis de ADN

La separación electroforética del ADN se llevó a cabo de forma horizontal empleando geles de agarosa en tampón TBE [1X]. El porcentaje de agarosa empleado osciló entre 0,8% y 2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Al gel siempre se le añadió bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el cual permite visualizar las moléculas de ADN con luz ultravioleta ($\lambda \leq 400 \text{ nm}$) al intercalarse en ellas.

El ADN, mezclado con tampón de carga [6X], fue sometido a un campo eléctrico generado mediante una corriente continua de un voltaje comprendido entre 30 y 120 V en función del tamaño y concentración del gel, así como del tamaño de las moléculas de ADN a separar. El tiempo empleado para la separación varió y fue inversamente proporcional al voltaje empleado en cada caso. La visualización de las moléculas de ADN se consiguió por la exposición del gel correspondiente a luz ultravioleta de rango de emisión entre 260 y 302 nm (onda corta-media). En el caso de fragmentos que posteriormente iban a ser purificados, clonados o secuenciados, se empleó luz UV de un rango de emisión de 365 nm (onda larga).

Con objeto de estimar la cantidad y/o tamaño de las moléculas de ADN, en los geles siempre se incluyó un patrón de ADN de concentración y tamaños moleculares conocidos. Los marcadores

de peso molecular más utilizados fueron el ADN de fago λ digerido con *Hind*III (Pharmacia) y *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen™).

II.2.2.2. Electroforesis de ARN

Con objeto de determinar la calidad e integridad de las muestras de ARN aisladas, siempre se llevó a cabo una electroforesis de ARN en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en tampón TBE [1X] estéril, y en cubetas tratadas con NaOH 50 mM durante al menos 3 horas (el resto del material utilizado se trató antes de entrar en contacto con el ARN como se indica en el apartado II.1.1.1). La muestra de ARN se aplicó al pocillo del gel junto con tampón de carga [6X] tratado con DEPC, y se sometió a electroforesis a 80 V durante el tiempo necesario para que las bandas de ARN ribosómico (ARNr) se separaran suficientemente.

La visualización de las moléculas de ARN se consiguió por la exposición del gel correspondiente a luz ultravioleta de rango de emisión entre 260 y 302 nm (onda cortamedia). Se consideró que el ARN presentaba una integridad adecuada cuando se observaron al menos dos bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S, siendo óptima una relación de intensidad dos veces superior para el ARNr 28S con respecto al ARNr 18S.

Al igual que en electroforesis de ADN, en los geles se incluyeron marcadores de peso molecular, con objeto de estimar la cantidad y tamaño de las moléculas de ARN.

II.3. Manipulación de moléculas de ADN

II.3.1 Purificación de fragmentos de ADN

II.3.1.1. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Independientemente del método de purificación empleado, la muestra de ADN problema siempre se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el fragmento de ADN de interés se escindió con un bisturí estéril directamente desde el gel mientras éste se visualizaba con luz ultravioleta de longitud de onda larga (365nm). Cuando el objetivo de la purificación fue la obtención de ADN de alta calidad a partir del gel, se empleó el kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial (www.qiagen.com). En otras ocasiones, se empleó el kit *Fermentas GeneJET Gel Extraction Kit*

(Fermentas), siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial (<http://www.thermoscientific.com>).

Apéndice 5: Soluciones empleadas en la electroforesis de ácidos nucleicos

Para las muestras de ARN se utilizó el mismo tampón de carga tratado con DEPC al 0,1% (v/v) y autoclavado posteriormente

Tampón TBE [1X]

Tris 44 mM
H₃BO₃ 90 mM
EDTA-Na₂ 2,2 mM
Ajustar pH 8

Tampón de carga [10X]

Glicerol 50%
Azul de bromofenol 0,25% (p/v)
Xilen-cianol (opcional) 0,25% (p/v)

II.3.1.2. Purificación de ADN a partir de una solución acuosa

El uso del sistema *Fermentas GenJET PCR Purification Kit* (Fermentas) permitió una eficaz purificación de fragmentos de ADN presentes en soluciones acuosas (productos de PCR, fragmentos resultantes de digestiones con endonucleasas, moléculas marcadas, etc). El proceso se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones suministradas por la casa comercial (<http://www.thermoscientific.com>). El ADN se recuperó directamente en H₂O estéril.

II.3.2. Concentración de muestras de ADN

Precipitación con etanol y acetato sódico

Las muestras de ADN disueltas en H₂O o tampón se precipitaron adicionando 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,6 a la muestra. Seguidamente, la mezcla se incubó a -80 °C durante, al menos, 30 minutos y el precipitado se recuperó por centrifugación a 15.000 g durante 30 minutos. El ADN recuperado se lavó sucesivamente con etanol al 70%, para eliminar sales residuales, y con etanol absoluto, centrifugando cada vez a 15.000 g durante 5 minutos para recuperar la muestra. El etanol residual se evaporó incubando la muestra en una estufa a 37 °C. Finalmente, el ADN se resuspendió en el volumen deseado de tampón o H₂O estéril.

Concentración por desecación

El ADN en disolución también se concentró por desecación al vacío a temperatura ambiente o a 50 °C, en un secador de vacío *SpeedVac SVC100* (Savant).

II.3.3. Digestión de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales correspondientes y durante un período comprendido entre 2 y 12 horas a 37 °C (salvo excepciones indicadas por las casas comerciales). Generalmente, en cada digestión se añadieron 5 U de enzima/ μg de ADN para asegurar una digestión completa. Las digestiones se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa en tampón TBE [1X] (*Materiales y Métodos, apartado II.2.2.1.*) de una parte alícuota de dicha muestra junto a la misma muestra sin digerir.

Apéndice 6: Mezcla de digestión enzimática

ADN (0,5-1 μg)	x μl
Tampón [10X]	2 μl
Enzima de restricción (5U)	0,5 μl
H ₂ O bidestilada	hasta 20 μl

II.3.4. Ligación de moléculas de ADN

Para que se lleve a cabo la ligación de dos moléculas de ADN (vector e inserto) es necesario digerir ambas previamente con la misma endonucleasa de restricción para generar extremos cohesivos capaces de unirse entre sí.

Desfosforilación del vector

Durante la ligación, el vector digerido con una única enzima de restricción puede religarse generando clones que sólo contendrían el plásmido empleado. Por tanto, es recomendable la desfosforilación del vector en cuestión para evitar un alto número de falsos positivos en los transformantes generados posteriormente. De esta manera, aumenta la garantía de que el vector sólo pueda recircularizarse una vez incluya el inserto que se quiere clonar. El proceso de desfosforilación se realizó añadiendo 1U de *fosfatasa alcalina* de timo de ternera (*CIAP*) (Invitrogen™) por cada volumen inferior o igual a 100 μl de vector digerido. La mezcla se incubó 15 minutos a 37 °C. En el caso de extremos protuberantes 3', se realizó una incubación adicional a 56 °C durante 15 minutos. Para inactivar la enzima, la mezcla se incubó 5 minutos a 70 °C y se fenolizó. El vector desfosforilado se recuperó por precipitación con etanol y acetato sódico (*Materiales y Métodos, apartado II.3.2.*).

Reacción de ligación

Las concentraciones de vector e inserto utilizadas para la ligación de fragmentos de ADN fueron proporcionales a los tamaños de las moléculas que se deseaba ligar. Se aplicó la relación:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times \text{relación vector/inserto} = \text{ng de inserto}$$

En el caso de ligaciones con el vector pGEM[®]-T Easy(Promega), se siguieron las instrucciones indicadas por la casa comercial que recomienda que la relación vector:inserto sea 1:3 para conseguir la mayor eficiencia.

Cuando el vector empleado fue pGEX-4T-1(Amershan), se utilizó una relación 1:5 entre el tamaño del vector y el inserto aplicando la relación:

$$\frac{2 \times \text{ADN (gramos)}}{\text{tamaño del inserto (pb)} \times 649 \text{ (Dalton/pb)}} \times \text{relación vector/inserto} = \text{moles de vector}$$

En cualquier caso, la mezcla de ligación se realizó como se indica en el *Apéndice 7* y ésta se incubó rutinariamente a 16 °C durante 14-16 horas antes de proceder a la transformación de células de *E. coli*.

Apéndice 7: Reacción de ligación	
Vector	x µl
Inserto	y µl
Tampón de ligación (Invitrogen TM) [5X]	1 µl
T4 ligasa (Invitrogen TM) 1 U/µl	1 µl
H ₂ O destilada estéril	hasta 10 µl

Cuando empleamos el vector pGEM[®]-T Easy(Promega), tanto la mezcla de ligación como el periodo de incubación fueron los recomendados por la casa comercial.

Apéndice 8: Enzimas empleadas en la desfosforilación y ligación de moléculas de ADN

<i>T4 DNA ligasa</i> (Invitrogen TM)	1 U/µl
<i>Fosfatasa alcalina de timo de ternera (CIAP)</i> (Invitrogen TM)	1 U/ml

II.3.5. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó con varios fines: a) en la comprobación de la orientación de los insertos correspondientes a los genes clonados en vectores de expresión; b) en la identificación de transformantes positivos (*Materiales y Métodos, apartado II.4.6.2*); c) y en estudios de expresión de los genes objeto de estudio mediante qRT-PCR (*Materiales y Métodos, apartado II.6.3*).

II.3.5.1. Cebadores universales empleados en la amplificación por PCR

Los cebadores universales (Tabla 2) se emplearon para la amplificación y, en algunos casos, para la secuenciación de fragmentos de ADN incluidos en los vectores pGEM[®]-T Easy, pGEX-4T-1, pCR[®]8/GW/TOPO[®], pDONR[™]221 y pDEST-TH1 (*Materiales y Métodos, apartados I.2.4. y I.2.5*). La temperatura de anillamiento siempre fue 55 °C y el programa de PCR empleado el que se detalla en la Tabla 5.

Tabla 2; Cebadores universales empleados.

Cebadores universales	
T7	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C -3'
T3	5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -3'
Reverse (M13)	5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G -3'
Forward (M13)	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'
Sp6	5'- GAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'
pGEX 5'	5'- GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG -3'
pGEX 3'	5'- CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG -3'

II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR

Los cebadores específicos utilizados en todos los casos para la amplificación de secuencias conocidas se diseñaron empleando el programa *Oligo 7.0* (Tabla 3 y 4).

Los oligonucleótidos empleados para la comprobación de las construcciones generadas en los distintos plásmidos, tanto por PCR como por secuenciación, fueron diseñados específicamente a partir de la secuencia conocida de cada uno de los plásmidos (Tabla 3).

Tabla 3; Cebadores específicos empleados en la comprobación de construcciones

Vector	Cebador	Secuencia
pK7WGF2	seq-GFP-Nt	5' - GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC - 3'
	seq-GFP-Ct	5' - AAG CACT GCA CGC CGT AGG TCA GGG - 3'
pDEST TM 22	PRO500	5' - GCG TTT GGA ATC ACT ACA GG - 3'
	PRO501	5' - AAC CTC TGG CGA AGA AGT CC - 3'
pDEST TM 32	pDEST32 seq 5'	5' - GAT TGG AGA CTT GAC CAA ACC TCT - 3'
	pDEST32 seq 3'	5' - GCC TCT AAC ATT GAG ACA GCA - 3'
pFRN pK7WG2	GUS1 up	5' - GCA CAA TCC CAC TAT CCT TC - 3'
	pFRN-Term low	5' - CGA AAC CGG CGG TAA GGA TCT GAG CTA C - 3'
pKGWFS7.0	seq-pKGWFS7 up	5' - TTG CGG TTC TGT CAG TTC CAA ACG - 3'
	seq-pKGWFS7 low	5' - CGC CCT CGC CGG ACA CGC TGA ACT - 3'

Los oligonucleótidos empleados en qRT-PCR fueron diseñados específicamente a partir de la secuencia conocida de cada uno de los genes, generalmente en el extremo 3'. El amplicón obtenido fue siempre entre 100 y 200 pb, tamaño recomendado para que la concentración de reactivos disponibles en la mezcla no sea limitante, no viéndose afectada ni la reacción de PCR ni la emisión de fluorescencia (*Materiales y Métodos, apartado II.6.3*).

Aunque todos los cebadores específicos fueron diseñados para trabajar con un rango de temperatura de anillamiento amplio (52-70 °C), generalmente se utilizó una temperatura de 55 °C para trabajar simultáneamente con varias parejas de cebadores. Cuando se observó la aparición de dímeros de cebadores o de bandas de amplificación inespecífica a esta temperatura, individualmente se determinó la temperatura óptima de anillamiento para cada pareja de cebadores. En ocasiones, algunos de estos oligonucleótidos también fueron empleados en la secuenciación de fragmentos de ADN o para la amplificación de fragmentos que posteriormente fueron subclonados en vectores plasmídicos. En general, las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción incluyó:

Mezcla de reacción de PCR		
Tampón de PCR	[10X]	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl
Mezcla de dNTPs	5 mM cada uno	1 µl
ADN molde	20-50 ng	x µl
Cebador 3'	2 µM	2,5 µl
Cebador 5'	2 µM	2,5 µl
Taq polimerasa	2 U	y µl
H ₂ O bidestilada estéril		hasta 25 µl

En todas las amplificaciones rutinarias, salvo excepciones, se utilizó el mismo programa básico recogido en la Tabla 4. La temperatura de anillamiento de los cebadores se determinó en función de sus secuencias y de la región de ADN que se iba a amplificar, pudiendo variar en un rango de 52-70 °C según la pareja de cebadores empleada.

Tabla 4. Programa para la amplificación por PCR de fragmentos de ADN.

Temperatura	Duración	Repeticiones
95 °C	2-5 min	1
95 °C	30 seg- 1 min	35-40 ciclos
T ^a anillamiento	30 seg - 1 min	
72 °C	1-2 min	
72 °C	5-10 min	1
10 °C	Mantenido	1

Invariablemente, siempre se comprobó que las reacciones de amplificación habían transcurrido de manera adecuada analizando una alícuota del volumen total de la mezcla de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (*Materiales y Métodos, apartado II.2.2.1*).

Apéndice 9: Soluciones empleadas en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN

Tampón de PCR [10X]

Tris-HCl pH 9 100 mM

KCl 500 mM

Autoclavar y añadir posteriormente Tritón X-100 al 15% (v/v)

II.3.6. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo con un secuenciador *ABI PRISM™ 3130 XL Genetic Analyzer* de *Applied Biosystems* en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI). Las muestras a analizar se prepararon siguiendo fielmente las instrucciones indicadas en el protocolo del *ABI PRISM™ Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*.

La obtención de ADN de alta calidad resultó ser un parámetro crítico del proceso de secuenciación, por ello el ADN se obtuvo utilizando distintos *kits* comerciales (*Materiales y Métodos, apartado I.1.3*).

II.4. Obtención de células competentes y transformación de bacterias

II.4.1. Preparación de células competentes permanentes de *E. coli* DH5a y BL21

Una colonia aislada de la estirpe deseada de *E. coli* se creció en medio LB a 37 °C y en agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, se tomó 1 ml de este cultivo y se inoculó en 100 ml de medio LB fresco y estéril contenido en un matraz de 250 ml y se incubó de nuevo a 37 °C y en agitación hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,48$.

Después de enfriar el cultivo en hielo, las células se recolectaron por centrifugación durante 5 minutos a 4.000 rpm y a 4 °C y, posteriormente, se resuspendieron en 20 ml de solución TfbI. Las células se incubaron nuevamente en hielo durante 5 minutos y se volvieron a recoger por centrifugación en las mismas condiciones anteriores. A continuación, se resuspendieron en 4 ml de solución TfbII y se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. Finalmente, se distribuyeron en tubos Eppendorf estériles en partes alícuotas de 100 µl y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Apéndice 10: Soluciones empleadas en la preparación de células competentes

Ambas soluciones, una vez preparadas, son filtradas y almacenadas a 4 °C

Solución TfbI	Solución TfbII
Acetato potásico 30 mM	MOPS 10 mM
KCl 100 mM	CaCl ₂ 75 mM
CaCl ₂ 10 mM	KCl 10 mM
MnCl ₂ 50 mM	Glicerol 15 %
Glicerol 15 %	pH 6.5 ajustado con KOH
pH 5.8 ajustado con ácido acético	

Las células competentes *E.coli* DH5a así preparadas se utilizaron para transformaciones convencionales, mientras que las células competentes *E.coli* BL21 se emplearon en la transformación con los plásmidos pGEX-4T-1 y pDEST-TH1 (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*). En el caso de la transformación de células de *E.coli* con los vectores plasmídicos del sistema Gateway, siempre se emplearon las células competentes comerciales *One Shot TOP10 Chemically competent E. coli* (Invitrogen™) (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*).

II.4.2. Transformación de células de *E. coli* químicamente competentes

En todos los casos, salvo cuando usamos las células *One Shot*[®] *TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen[™]) comerciales (dispensadas en alícuotas de 50 µl), la muestra de ADN (~45 ng) que se deseaba transformar se mezcló con una parte alícuota de células competentes (100 µl). La mezcla obtenida se incubó en hielo durante 30 minutos. Seguidamente, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 1 minuto e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 2 minutos. A continuación, se les añadió 1 ml de medio SOC estéril y se incubaron a 37 °C en agitación constante durante, al menos, 1 hora para reactivar el metabolismo celular. Una vez transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación rápida a 15.000 g a temperatura ambiente y se volvieron a resuspender en 150 µl de LB. Las células se sembraron en medio LB sólido conteniendo los antibióticos adecuados para la selección de los transformantes positivos y se dejaron crecer a 37 °C durante 12 horas.

Apéndice 11: Soluciones empleadas en la obtención de células competentes y transformación de *E. coli*.

Medios LB líquido y LB sólido Ver Apéndice 1	Medio SOC (Autoclave) Triptona 2% Extracto de levadura 0,5% NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM Glucosa 20 mM
--	---

II.4.3. Preparación de células competentes permantes de *A. tumefaciens* LBA4404, GV3101 y AGL0.

Este protocolo se empleó para obtener células químicamente competentes de varias estirpes de *A. tumefaciens* que posteriormente fueron transformadas.

Se creció una colonia aislada de *A. tumefaciens* (LBA4404, GV3101 o AGL0) a 28 °C en 50 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes según la cepa (*Materiales y Métodos, apartado I.2.2*). Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 0.5, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 3.500 rpm y las células recogidas se resuspendieron en 10 ml de NaCl 0.15 M. Las células en suspensión se sometieron nuevamente a centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente pero, en esta ocasión, el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 20 mM frío. La suspensión celular obtenida se distribuyó en alícuotas de 200 µl.

II.4.4. Transformación de células de *A. tumefaciens* químicamente competentes

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se llevó a cabo añadiendo 0.5-1 µg del ADN plasmídico de interés a una alícuota de células y dejándolas incubar en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico brusco congelándolas en nitrógeno líquido durante 1 minuto e inmediatamente después incubándolas a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB a la muestra transformada y se mantuvo a 28 °C en agitación suave entre 2-4 h para su recuperación. Tras este tiempo, las células se recogieron mediante una centrifugación rápida, se resuspendieron en 100 µl de LB fresco, y se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos adecuados. Las placas se depositaron en una estufa a 28 °C y las células se dejaron crecer entre 48-72 horas.

II.4.5. Selección de transformantes bacterianos positivos

La selección de transformantes positivos se realizó en función de los marcadores de selección contenidos en los vectores plasmídicos empleados para la transformación. Se consideraron transformantes positivos aquellas células que, además de crecer en las condiciones de selección, también portaban el vector plasmídico con el inserto correcto utilizado en la ligación original.

II.4.5.1. Selección por antibióticos

Inicialmente, la selección de los transformantes positivos se realizó en medio selectivo LB sólido suplementado con los antibióticos a los que confería resistencia el vector introducido. En el caso del vector plasmídico pCR[®]8/GW/TOPO[®] y el vector binario pK7WGF2.0, portadores del gen de resistencia a espectinomicina, la selección de los transformantes positivos se llevó a cabo en medio LB-agar suplementado con espectinomicina (100 µg/ml). Cuando los vectores empleados en la transformación fueron pGEM[®]-T Easy, pGEX-4T-1, pYES2, pUG35 pDEST-TH1 o pDEST[™]22, la selección de los transformantes positivos se realizó en presencia de ampicilina (100 µg/ml), mientras que los transformantes portadores del vector pDONR[™]221y del vector binario pFRNse seleccionaron en presencia de kanamicina (50 µg/ml), y los transformantes con el vector pDEST[™]32 se seleccionaron en presencia de gentamicina (25 µg/ml) (*Materiales y Métodos, apartados I.2.4, I.2.5 y I.2.6*).

Las cepas de *A. tumefaciens* empleadas presentan además, resistencia a rifampicina (AGL0); rifampicina, gentamicina y kanamicina (GV3101); o rifampicina y espectinomicina/estreptomicina (LBA4404). Así, la selección de transformantes positivos de *Agrobacterium* se realizó añadiendo al medio simultáneamente los antibióticos a los que las cepas

empleadas eran resistentes y el antibiótico adecuado en función del vector introducido en ellas (*Materiales y Métodos, apartado I.2.2*).

II.4.5.2. Selección por antibióticos, IPTG y X-gal

En el caso de las construcciones derivadas del vector pGEM[®]-T Easy (que porta como marcadores el gen de resistencia a ampicilina y el gen de la β -galactosidasa) (*Materiales y Métodos, apartado I.2.4*), la selección de transformantes positivos se realizó sembrando las células transformadas en placas de LB sólido suplementadas con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), 40 μl de solución de IPTG (0,1 M en H₂O, esterilizado por filtración y almacenado a -20 °C) y 40 μl de solución de X-gal (20% p/v en N-N-dimetilformamida, almacenado a 4 °C), y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Una vez crecidas las colonias, se seleccionaron aquellas que presentaron un color blanco, lo que significaba que se había producido la inserción del fragmento de ADN exógeno en el sitio de clonación múltiple del vector provocando la interrupción del gen de la β -galactosidasa, e impidiendo así la síntesis correcta de la enzima que capacitaría a la bacteria para hidrolizar el X-gal y producir el compuesto (5-bromo-4-cloro-3-indol) que colorea la colonia de azul.

II.4.6. Identificación de transformantes positivos

II.4.6.1. Identificación de transformantes positivos mediante análisis de restricción

A fin de comprobar que las supuestas colonias positivas incluían los vectores de clonación con el inserto de interés en cada caso, se aisló ADN plasmídico de cada transformante positivo seleccionado y se digirió con la enzima de restricción adecuada para liberar el inserto o un fragmento de éste (*Materiales y Métodos, apartado II.3.3*). Posteriormente, éste se visualizó electroforéticamente en gel de agarosa (*Materiales y Métodos, apartado II.2.2.1*)

II.4.6.2. Identificación de transformantes positivos mediante PCR

Para comprobar si los transformantes positivos contenían el vector de clonación con el inserto de interés correspondiente en cada caso, se procedió a su amplificación mediante PCR a partir de ADN plasmídico previamente aislado, o bien, directamente a partir de la colonia seleccionada. Para ello, se emplearon los cebadores universales incluidos dentro del vector (T3, T7, Forward M13 y Reverse M13) (Tabla 2) y/o cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia interna del inserto (Tabla 4). La reacción de PCR se realizó como se indica en *Materiales y Métodos, apartado II.3.5*. Cuando la PCR se hizo directamente a partir de colonia,

fue necesario siempre realizar una réplica de la colonia seleccionada en una nueva placa de LB-agar con el antibiótico de selección para mantener la línea celular.

II.5. Obtención de células competentes y transformación de levaduras

II.5.1. Obtención de células competentes y transformación de *Saccharomyces cerevisiae* (protocolo a pequeña escala).

Las cepas de levaduras PJ69-4a y PJ69-4 α se dejaron crecer a 30 °C durante 24 horas en medio SD completo hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. Para cada transformación, se tomaron 2 ml de dichos cultivos, se centrifugaron durante 5 segundos a máxima velocidad y las células fueron resuspendidas en 1 ml de LiAc 100 mM. Se dejaron incubar durante 5 minutos a 30 °C y se centrifugaron de nuevo. A continuación, se resuspendieron con la mezcla de transformación, se les dió un paso por vórtex de 1 minuto y se dejaron incubar durante 20 min a 42 °C. Las células fueron recogidas de nuevo por centrifugación, resuspendidas finalmente en 50 μ l de H₂O MQ, plaqueadas en medio SD de selección e incubadas durante 3 días a 30 °C.

Apéndice 12: Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a pequeña escala

240 μ l PEG 50% (PEG 3350)
36 μ l 1 M LiAc
5 μ l ADN esperma de salmón (10mg/ml)
3 μ l ADN plasmídico (~500 ng)
76 μ l H₂O MQ
360 μ l volumen total

II.5.2. Obtención de células competentes y transformación de *Saccharomyces cerevisiae* (protocolo a gran escala).

Un matraz con medio SD (50 ml) sin leucina fue inoculado con varias colonias de levaduras PJ69-4 α portadoras de la construcción “bait” de interés y se dejó crecer a 30 °C durante 16-18 horas en agitación (300 rpm) hasta alcanzar su fase estacionaria (DO₆₀₀ > 1.5). A su vez, 30 ml del cultivo anterior se transfirieron a un matraz de 1 L con 300 ml de medio SD sin leucina y se incubaron a 30 °C durante 1.5-3 horas en agitación (300 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4-0.6. A continuación, las células fueron recogidas por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 ml de tampón TE [1X] estéril. Posteriormente, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, se

resuspendieron con la mezcla de transformación mediante agitación en vortex durante 1 minuto y se dejaron incubar a 30 °C durante 10 minutos a 200 rpm. A continuación, se añadieron 1.4 ml de DMSO a las células, se mezclaron bien por inversión y se aplicó un choque térmico a 42 °C en un baño termostatzado durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se enfriaron en hielo durante 1-2 minutos y se recogieron por centrifugación a 2300 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las células obtenidas se resuspendieron en 12 ml de tampón TE [1X]. Finalmente, las células fueron plaqueadas en medio SD de selección y se dejaron incubar durante 3 días a 30 °C.

Apéndice 13: Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a gran escala
1.5 ml TE [1X]/100 mM LiAc 50 µl librería ADN copia (200-300 ng/µl) 200 µl ADN de esperma de salmón 12 ml PEG-3350 (50 %) 1.5 ml TE [10X] 1.5 ml LiAc 1M
Tampón TE [1X] pH 7.4 Tris 100 mM EDTA 10 mM

II.5.3. Selección por aminoácidos

La selección de los transformantes positivos se realizó en medio selectivo SDglu sólido suplementado con todos los aminoácidos excepto con el que confería resistencia a los transformantes según el vector que se les hubiera introducido. Así, para la selección de transformantes haploides en el experimento de doble híbrido, el vector plasmídico pDESTTM22 confería viabilidad a los transformantes en ausencia de triptófano mientras que el vector plasmídico pDESTTM32 confería viabilidad a los transformantes en ausencia de leucina. Por tanto, los transformantes diploides que portaban ambos vectores fueron seleccionados en medio SDglu en ausencia de leucina y triptófano. Los vectores pYES2 y pUG35 confieren viabilidad a los transformantes frente a la ausencia de uracilo.

II.6. Estudios de expresión génica

II.6.1. Tratamiento del ARN con *DNaseI*

Previamente a su retrotranscripción, todas las muestras de ARN usadas se trataron con *DNaseI* libre de *RNases* (InvitrogenTM) para eliminar cualquier residuo de ADN genómico

arrastrado durante su extracción y así evitar amplificaciones inespecíficas en posteriores reacciones de amplificación. El tratamiento con *DNasaI* se aplicó a muestras de 40-50 µg de ARN total.

Apéndice 14: Tratamiento de ARN con *DNasaI*

Muestra de ARN total (40-50 µg)	× µl
Tris-HCl [1M] pH 7,5	4 µl
MgCl ₂ [0,1 M]	6 µl
<i>DNasaI</i> (<i>RNasa free</i>) (Invitrogen™) [7,5 U/ml]	1 µl
H ₂ O-DEPC	hasta 100 µl

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 3 horas, teniendo cuidado de no sobrepasar este tiempo (un aumento del tiempo de incubación produce cierta degradación y menor recuperación de ARN). Posteriormente, la muestra fue tratada con igual volumen (1:1) de mezcla fenol:cloroformo (v/v) y cloroformo sucesivamente. La fase acuosa recuperada se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico [3M] pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% a -80 °C durante 1 hora. El ARN precipitado se recuperó por centrifugación y se resuspendió en 20 µl de H₂O estéril tratada con DEPC. Todas las soluciones empleadas se trataron con DEPC y se esterilizaron antes de su uso. La concentración y el grado de pureza del ARN tratado y precipitado se determinaron con un espectrofotómetro *NanoDrop* (*ND-100Spectrophotometer*). La integridad de las muestras se determinó mediante su visualización en gel de agarosa al 1% (p/v).

II.6.2. Comprobación de la pureza del ARN total

Antes de proceder a la retrotranscripción del ARN tratado con *DNasaI*, siempre se estimó el grado de pureza de las muestras correspondientes mediante la determinación de su grado de contaminación por polisacáridos y proteínas. Para ello se determinó la relación Abs_{260nm}/Abs_{230nm} (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1.*) Finalmente, y una vez comprobada la calidad de la muestra, el volumen total se diluyó hasta una concentración de trabajo de 1µg/ml.

II.6.3. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (“*quantitative real-time PCR*”; qRT-PCR), permite cuantificar la cantidad de ARNm correspondiente a un gen determinado en una muestra. Esta cuantificación se consigue mediante la medida del incremento de fluorescencia emitida por el amplicón correspondiente a ese gen en cada ciclo de amplificación.

La cuantificación basada en medidas a tiempo final son inexactas debido a que pueden verse seriamente afectadas por la limitación de reactivos, posibles diferencias en los componentes de la reacción o por el número de ciclos. Sin embargo, la cuantificación en tiempo real del número de copias inicial de un gen se basa en el ciclo umbral (Ct), que se define como el número de ciclos al cual la fluorescencia es estadísticamente significativa sobre el ruido de fondo. Este valor de Ct es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales de un gen y, por tanto, a menor valor de Ct mayor cantidad de moléculas iniciales existen.

La información cuantitativa basada en el Ct es más exacta que la información basada en las determinaciones a tiempo final debido a que están basadas en medidas tomadas a lo largo de la fase exponencial de amplificación por PCR, cuando la eficiencia de ésta no se ha visto afectada todavía por la limitación de reactivos, diferencias en la composición de la reacción o en los ciclos de la PCR.

Aunque existen varias estrategias de emisión de fluorescencia detectable en la PCR cuantitativa en tiempo real, en este trabajo se optó por el uso del fluoróforo *SYBR-GreenI*. Este compuesto es una molécula similar al bromuro de etidio que se intercala en la doble cadena de ADN emitiendo entonces su señal de fluorescencia. Debido a que su unión se produce a moléculas de doble cadena, en este caso fue más conveniente detectar la señal fluorescente emitida en el paso de extensión de la PCR (72 °C). Por esta misma razón, fue también necesario optimizar la temperatura de anillamiento de los cebadores que se iban a emplear para seleccionar una temperatura que redujera o eliminara completamente la formación de dímeros de cebadores y así evitar una interferencia en la señal de emisión. Posteriormente, y en caso de aparición de dímeros de cebadores, siempre se seleccionó una temperatura de medida de emisión de fluorescencia ligeramente por encima de la temperatura de disociación de éstos. Dicha temperatura se calculó a partir de las curvas de “*melting*” (ver más adelante). No obstante, los dímeros de cebadores, cuando aparecieron, lo hicieron en los ciclos finales de la PCR, donde no interfirieron con el valor de Ct del amplicón que apareció en los primeros ciclos de la reacción.

II.6.3.1. Reacción de retrotranscripción

La retrotranscripción de las muestras a analizar se realizó empleando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche). La enzima empleada es una transcriptasa reversa que combina alta sensibilidad y alta termoestabilidad, llegando a sintetizar productos de cDNA de gran longitud (hasta 14 kb) empleando sólo el cebador oligo (dT)₁₈ incluido en el *kit*. Debido a su termoestabilidad, el uso de esta enzima está recomendado para una amplia variedad de moldes

(ARN con regiones ricas en GC y estructuras secundarias). La síntesis de la cadena monocatenaria de ADNc se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

II.6.3.2. Reacción de amplificación por PCR a partir de ADNc

A partir de los ADNc sintetizados previamente, se llevaron a cabo amplificaciones en tiempo real que permitieron comparar los niveles de transcrito correspondientes a los genes en estudio en condiciones experimentales frente a condiciones control. La reacción de amplificación en tiempo real se realizó en un iCycler iQ system (Bio-Rad) con capacidad para amplificar 96 muestras independientes de forma simultánea a las que se les asignó unas coordenadas individuales e identificables tanto por el ordenador como por el experimentador durante todo el proceso.

En primer lugar, se diseñó la distribución de las muestras en cada uno de los 96 pocillos de la placa de experimentación. En cada placa, se incluyeron por triplicado tanto las muestras correspondientes al gen control constitutivo, que sirvieron para normalizar los datos obtenidos en la PCR cuantitativa, como las correspondientes a los genes en estudio. Así, para cada gen, se realizaron tres reacciones independientes de PCR cuantitativa a partir de la misma muestra de ADNc en cada una de las situaciones experimentales analizadas que nos proporcionó una media del valor de Ct para cada muestra. Obligatoriamente, en cada placa de experimentación también se incluyó una muestra con 20 ng de ADN plasmídico correspondiente a cada uno de los genes en estudio incluidos en la placa, y dos muestras control sin ADN.

La amplificación de las muestras se llevó a cabo empleando los kits *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (Bio-Rad) o *SsoAdvancedTM SYBR[®] Green SuperMix* (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso.

Para minimizar los errores por pipeteo, se preparó una mezcla madre para la reacción de PCR. A partir de ella, se repartieron con una pipeta multicanal 10 µl de reacción por muestra en cada uno de los pocillos, manteniendo el orden previamente establecido para cada muestra y evitando la formación de burbujas que impidieran una correcta detección de la fluorescencia emitida. Posteriormente, la placa (*iQTM 96-Well PCR Plates*, Bio-Rad) se cubrió con una lámina transparente de plástico (*Microseal[®] 'B' Adhesive Seals, Optical*, Bio-Rad) evitando dejar alguna huella sobre la misma que pudiera interferir en la emisión de fluorescencia. Cuando esta lámina de plástico sufre el primer calentamiento en el termociclador, la placa se sella completamente evitando la pérdida de muestra por evaporación.

En general, en todas las amplificaciones realizadas se empleó el mismo programa básico (Tabla 4) y el resultado de cada amplificación se visualizó directamente para cada ciclo durante el transcurso de la reacción (Figura 12).

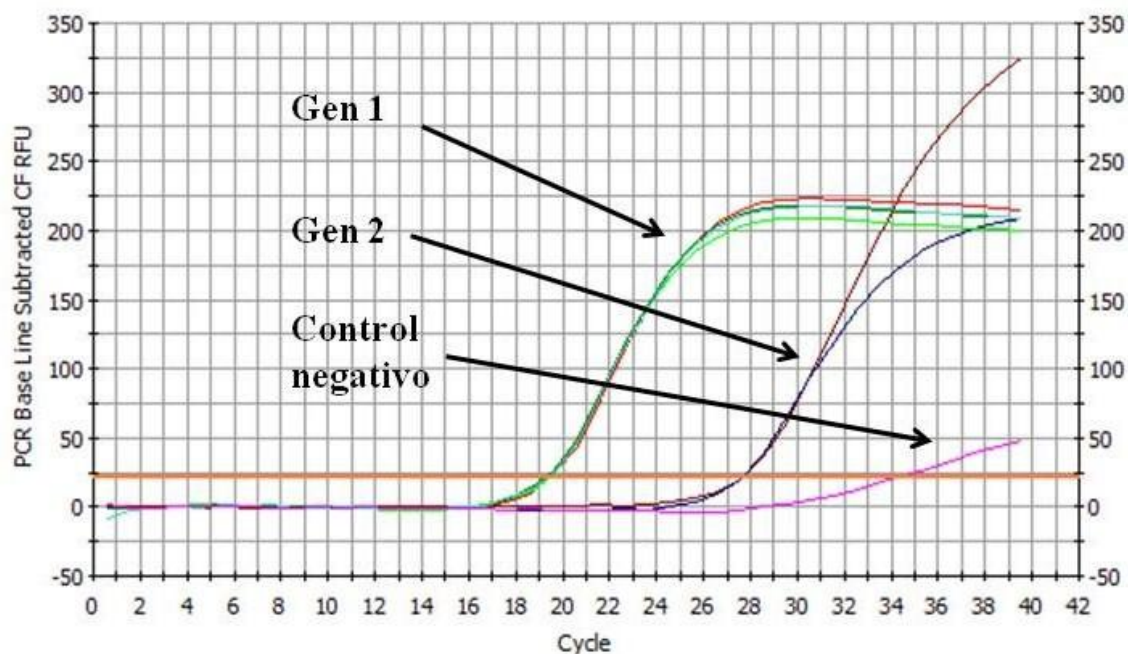


Figura 12: Ejemplo de curvas de amplificación en un *iCycler iQ* system (Bio-Rad). Se muestran las curvas correspondientes a un gen problema (gen 1) y al gen interespaciador *26S-18S* (gen 2). También, se representa la curva de amplificación correspondiente al control negativo (sin ADNc), cuya señal de fluorescencia corresponde a la formación de los dímeros de cebadores.

II.6.3.3. Curva de fusión de las muestras amplificadas

Una vez terminada la amplificación de las muestras, éstas se sometieron a un programa de desnaturalización progresiva (“programa de *melting*”) (Tabla 5) que nos proporcionó una curva de fusión independiente (*curva de melting*) para cada una de las muestras amplificadas (Figura 13A). Este programa se basa en el aumento progresivo de 0,5 °C de temperatura por ciclo, desde una temperatura inicial de 60 °C hasta una final de 95 °C. De esta manera, las moléculas de menor tamaño y con menos puentes de hidrógeno intercatenarios se disociarán antes que las de tamaño superior, que poseen un mayor número de puentes, detectándose una curva de fusión diferente para cada una de las especies moleculares existentes en la muestra. Por tanto, las curvas de “*melting*” se emplearon para determinar el número de amplicones presentes en una misma reacción de PCR y detectar posibles contaminantes (Figura 13B). También, fueron útiles para normalizar la reacción y eliminar el ruido de fondo de los dímeros de cebadores.

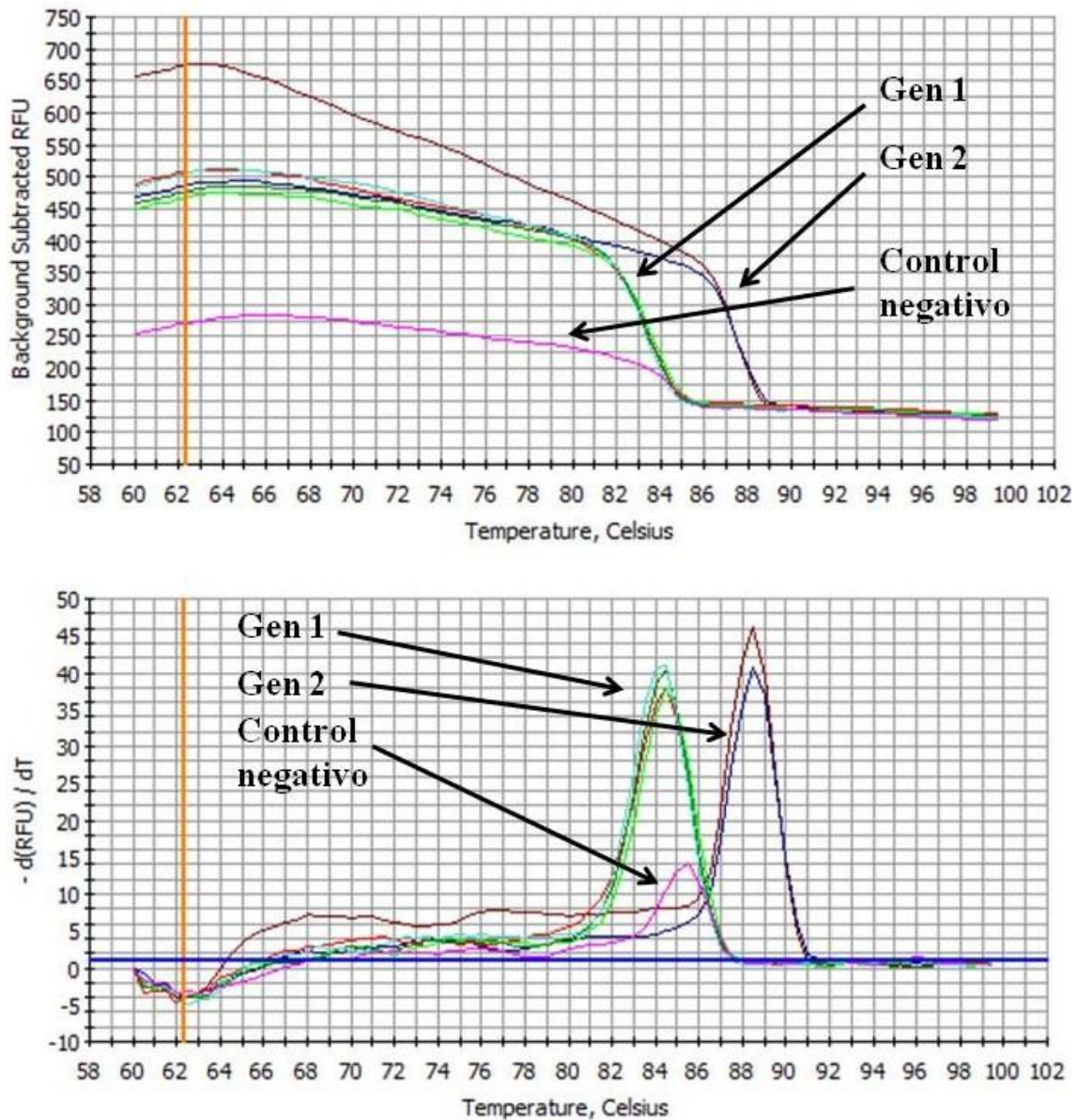


Figura 13: Curva de *melting* correspondiente a los amplicones generados por qRT-PCR en el sistema *CycleriQ system* (Bio-Rad). Se muestran las curvas de fusión correspondientes a un gen problema (gen 1) y al gen interespaciador *26S-18S* (gen 2). **A**, Señal de fluorescencia frente a temperatura; **B**, Derivada de la señal de fluorescencia [$-d(RFU)/dT$] frente a temperatura. No se observa la aparición de contaminantes, ya que sólo aparece un pico por muestra. Además, comprobamos que la temperatura de *melting* (T_m) es constante para el amplicón correspondiente a cada gen.

Tabla 5: Programa de *melting* empleado para la generación de curvas de fusión.

Temperatura	Duración	Repeticiones
95 °C	3 min	1
60 °C	30 seg	1
60 °C + 0,5 °C/ciclo	10 seg	78
4 °C	mantenido	

II.6.3.4. Análisis de los datos

Invariablemente, siempre se analizaron en primer lugar las curvas de fusión obtenidas para todas las muestras incluidas en la placa en estudio. De esta manera, se determinó la existencia o no de dímeros de cebadores y de una o varias especies moleculares. Estos datos nos permitieron confirmar que las amplificaciones cuantificadas se habían realizado de forma específica y que los valores de Ct obtenidos correspondían únicamente al transcrito del gen en estudio.

Los valores de Ct se obtuvieron automáticamente a partir de una línea base que el programa define por defecto, aunque estos valores pudieron ser modificados para ajustar el análisis adecuadamente. Se estudió el comportamiento individualizado de cada curva obtenida a fin de desechar las curvas alteradas. El hecho de poseer tres datos por muestra permitió comparar los valores de Ct obtenidos en todos los casos y hacer una media de los valores fiables.

II.6.3.5. Normalización y representación de los datos

Los valores de Ct obtenidos para cada una de las muestras analizadas fueron normalizados frente a los valores de Ct de un gen control constitutivo. La normalización permite corregir la concentración de ARN inicial por muestra en la RT y la eficiencia de la reacción de PCR de cada muestra.

En este trabajo se emplearon varios genes como control: el gen NDR1 y el gen que codifica la región interespaciadora 26S-18S, ambos de expresión constitutiva y constante en todas las condiciones experimentales analizadas.

En general, la normalización se llevó a cabo según la siguiente fórmula (Pedersen, 2001):

<p>Incremento de la expresión = $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo}$ y $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ gen inducido} - \Delta Ct \text{ control}$</p>
--

Una vez normalizados los datos, éstos se expresaron respecto al control del experimento o respecto a la muestra con menor valor de expresión, al que se le asignó un valor igual a la unidad. El resto de valores se representaron por comparación con éste. Para el análisis estadístico de los datos mediante la *t* de Student, se empleó el programa *GraphPad InStat* considerando un valor de confianza de $p < 0.01$, lo que nos permitió identificar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

II.7. Generación y análisis de *microarray*

Las secuencias de ADNc contenidas en la librería de Kevin Folta (Shulaev *et al.*, 2011) fueron comparadas con las secuencias de ADNc contenidas en nuestra propia librería (Bombarely *et al.*, 2010). El porcentaje de identidad entre las secuencias de ADNc de *Fragaria × ananassa* y *Fragaria vesca* fue en todos los casos superior a 98,6%. De este modo, se decidió generar una plataforma de microarray basada en oligos (60 nucleótidos de longitud) conteniendo un total de 35.234 secuencias únicas correspondientes a las secuencias publicadas en el proyecto del genoma de fresa (<http://www.strawberry.org>).

Para cada secuencia, se diseñaron 4 oligos que fueron hibridados por cada bloque y cuatro bloques fueron hibridados para cada set de datos. Las muestras de ARN total fueron tratadas con DNaseI y purificadas por columna *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. El marcaje de las muestras (Cy3), la hibridación con las 4 sondas por secuencia y la normalización de los datos fueron llevados a cabo por Nimblegen Systems Inc., según el procedimiento descrito en la sección de análisis de expresión disponible en <http://www.nimblegen.com/>.

En general, se procesaron 10 µg de ARN total procedente de receptáculo de fruto de fresa (*Roche cDNA Synthesis System*). Este sistema está optimizado para la síntesis de ADNc de doble cadena que, una vez obtenido, fue purificado con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche) según el protocolo aportado por la casa comercial. Las muestras purificadas se sometieron a transcripción reversa, llevando a cabo tres reacciones de transcripción reversa por cada muestra de partida de ARN total. Cada muestra de ADNc obtenida fue marcada por cebadores al azar con nonúmeros de Cy3 usando el kit de marcaje *NimbleGen One-Color DNA Labeling* según el protocolo estándar de Roche NimbleGen. Se empleó 1 µg de ANDc en cada reacción de marcaje. Cada muestra de ADNc marcada con Cy3 fue aplicada sobre el array 12x135K diseñado mediante asignación al azar (cada cristal contiene 12 arrays independientes, cada uno con 140856 sondas cubriendo 35214 genes y con 4 sondas por gen diana). La hibridación del array se llevó a cabo a 42 °C durante 16 horas, posteriormente fue lavado, secado y escaneado a una resolución de 2 µm usando un escáner NimbleGen MS 200 Microarray Scanner. Las señales de fluorescencia a partir de las imágenes escaneadas se extrajeron con el programa NimbleScan version 2.6 (Roche NimbleGen) y su análisis y la generación de valores de expresión génica se llevó a cabo con el programa Robust Multi-Array (RMA). El análisis RMA se realizó a partir de las réplicas del array obtenidas para cada condición experimental, muestra y cantidad de partida (por ejemplo, se realizaron análisis

RMA por separado para cada conjunto de datos procedente de las 3 réplicas de hibridación de ADNc obtenido a partir de 10 µg de ARN total).

El análisis de datos de los estudios de expresión del microarray se llevó a cabo con el programa de análisis de expresión génica Array Star (DNASTAR). Las pruebas estadísticas *t*-test y FDR (Benjamini y Hochberg, 1995) para correcciones de pruebas múltiples fueron realizadas con un valor de confianza $p < 0.01$, que nos permitió identificar diferencias estadísticamente significativas.

II.7.1 Anotación de secuencias a partir de una librería de ESTs

Se empleó el programa Blast2GO v2.7.2 para la anotación funcional de las secuencias EST utilizando BLASTX con un valor de corte esperado de $1.0E-10$ y su propia base de datos pública a fecha de septiembre de 2013 (Conesa *et al.*, 2005). Se tuvieron en cuenta para este análisis sólo los genes del microarray que presentaban valores de expresión superiores o inferiores a ± 2 veces. Los datos de GO para cada secuencia fueron enriquecidos usando ANNEX (Annotation Augmentation) and aquellos incluidos en la base de datos de InterPro. Los gráficos de datos GO también fueron obtenidos con este programa.

II.8. Extracción de compuestos volátiles, pigmentos y hormonas del fruto de fresa

II.8.1. Extracción de compuestos volátiles

Extracción de eugenol. Método de Luke

Se tomaron 5 g de tejido (peso fresco) pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en 50 ml de acetona:éter de petróleo:diclorometano (1:1:1) y 5 g de MgSO₄ para desecar la muestra. La mezcla fue homogeneizada con la ayuda de un ultraturrax y centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un matraz de evaporación esmerilado apropiado para la desecación de la muestra en un rotavapor o evaporador rotatorio a presión reducida. Finalmente, el extracto fue reconstituido en un 1 ml de ciclohexano:acetona (9:1) y analizado por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS).

II.8.1.1. Análisis de productos por GC-MS

Los análisis realizados por GC/MS fueron llevados a cabo con un detector Triple Cuadrupolo (CG/MS Bruker Mod. SCION). La columna de GC utilizada es de 30 m y 0,25 mm d.i. con fase 5%fenilsilicona (0,25 µm). Se inyectó 1 µl de muestra en modo splitless a 250°C, trabajando

con un programa de temperatura de horno de 60°C (2 min.), 5°/min hasta 300°C (5 min.). La detección por MS se realizó en modo de ionización de Impacto Electrónico (70 eV) y detección de iones SIM (Selecting Ion Monitoring) monitorizando tres iones por analito. La cualificación del mismo se realizó en base a los tiempos de retención (desviación <0.5%) y los ion ratio de los dos iones de cualificación (desviación <15%) tal y como marcan diferentes normas de referencia. La cuantificación se llevó a cabo en base a rectas de calibrado obtenidas previamente en modo externo y en un rango de trabajo comprendido entre 5 y 250 ng/ml.

II.8.2. Extracción de antocianinas y clorofila

Extracción de antocianinas totales

Se tomó un 1 g de tejido (peso fresco) pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en 10 ml de 1 mol/l de HCl-metanólico (12N HCl:99,9% MeOH = 1:35) durante 72 h a 4 °C en agitación constante. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad y el sobrenadante fue recuperado. El contenido total de antocianinas de cada muestra fue calculado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm (Rabino y Mancinelli, 1986) y aplicando la fórmula $A_{530} - 0,25 A_{657}$ para eliminar la influencia de la clorofila contenida en los extractos analizados (Mancinelli y Schwartz, 1984). Se realizaron, al menos, 3 extracciones independientes de cada muestra. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa informático GraphPad InStat (*Materiales y Métodos, apartado II.15*).

Extracción de clorofila

Se emplearon 100 mg de tejido (peso fresco) pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en 1,7 ml de acetona al 80% y en oscuridad durante 30 min. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recuperados y mantenidos en hielo y oscuridad. El proceso de extracción fue repetido dos veces más y todos los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados. El contenido de clorofila de las muestras se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 645 nm y 663 nm, aplicando las siguientes fórmulas: Clorofila A (mg/g) = $(12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}) \times V/1000 \times \text{peso fresco de tejido}$; Clorofila B (mg/g) = $(22,9 A_{645} - 4,86 A_{663}) \times V/1000 \times \text{peso fresco de tejido}$. Se realizaron, al menos, 3 extracciones independientes de cada muestra. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa informático GraphPad InStat (*Materiales y Métodos, apartado II.15*).

II.8.3. Extracción de ABA

Para la extracción de ácido abscísico a partir de frutos de fresa, se empleó como estándar interno ácido abscísico deuterado (dABA). Durante su preparación, los protones del anillo del ABA (5 mg) se intercambiaron durante al menos 48 horas en 10 ml de agua pesada (Sigma: pureza isotópica 99,96%) a temperatura ambiente y en presencia de hidróxido de sodio 1M deuterado (Sigma: pureza isotópica 99%) (Rock y Zeevaart, 1990). El medio se acidificó a pH 3 con ácido clorhídrico. La solución ácida se mezcló con éter dietílico (50:50, v/v), se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se desecó a 35 °C. Las muestras que contenían [H] se disolvieron en metanol. La pureza del [²H₆]-ABA fue evaluada mediante HPLC en las condiciones indicadas a continuación.

En la extracción de ABA se empleó 1 g de fruto de fresa (*Materiales y Métodos, Apartado I.2.1*) que fue homogenizado en N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. La muestra triturada fue colocada en un vaso de vidrio de 50 ml y se mezcló con 1,26 nmol del estándar interno (40 µl de 31,5 nmol mL⁻¹) mediante agitación durante 5 minutos. La mezcla obtenida se extrajo dos veces con 10 ml de metanol / agua pH 5.5 (50:50; v/v) en agitación durante 30 minutos y posteriormente fue centrifugada a 5000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recogido y extraído por duplicado con 10 ml de diclorometano. Los extractos de diclorometano obtenidos fueron centrifugados a 5000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y la fase inferior se dejó evaporar a 40 °C. El residuo se disolvió en 100 µl de acetona 100% y en 250 µl de agua/acetonitrilo (70:30, v/v) (0,1% ácido fórmico). Finalmente, la muestra se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos utilizando el sobrenadante recuperado para su medida por HPLC-MS (1200 L TripleQuadrupole). El volumen de inyección fue 8 µl y la columna empleada fue C18 Phenomenex, con una i.d. 150x2.1 mm y un tamaño de partícula de 3 µm. La fase móvil empleada estuvo compuesta de agua/acetonitrilo (70:30; v/v) (0,1% ácido fórmico), con un flujo de 0.2 mL min⁻¹. La MS constó de un sistema SIM (Selecting Ion Monitoring) y el flujo de N₂ empleado (calidad LC-MS) fue de 50 L/h. La tensión del capilar fue de 5,5 kV. El tiempo de permanencia elegido fue de 1 s/scan. El ABA fue detectado a una longitud de onda de 263 nm y el dABA a 268-269 nm. Para procesar los datos cuantitativos obtenidos a partir de los estándares de calibración y las muestras de las plantas se empleó el software 5.1 DataAnalysis (Bruker Daltonics).

II.9. Generación de plantas transgénicas

II.9.1. Introducción a la metodología Gateway

La tecnología Gateway[®] es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades específicas de recombinación del bacteriófago λ (Landy, 1989). Este sistema utiliza una mezcla de enzimas de recombinación constituida por la *Integrasa* (*Int*), una *Excisionasa* (*Xis*) y la proteína IHF (*Integration Host Factor*) codificada por *E. coli* para catalizar la reacción de recombinación LR clonasa Gateway[®] *in vitro* entre un *Entry vector* (pCR[®]8/GW/TOPO[®]), que contiene el ADN de interés flanqueado por las regiones *attL*, y un *Destination vector* (pFRN) que incluye las regiones *attR*. Mediante esta recombinación específica entre los sitios *att* (*attR* x *attL* ↔ *attB* x *attP*) se genera un vector de expresión destinado a la obtención de plantas transgénicas (Figura 6).

Apéndice 15: Obtención del ADN copia completo (“full-length”)	
Mezcla de reacción de PCR	Programa utilizado
5X iProofHF Buffer 10 μ l dNTPs (5 mM) 2 μ l FLNCED1-up* (2 μ M) 12,5 μ l FLNCED1-low* (2 μ M) 12,5 μ l <i>iProof DNA polimerasa</i> 0,5 μ l ADNc 2 μ l H ₂ O 10,5 μ l	98 °C, 1 min 98 °C, 10 seg 55 °C, 30 seg 72 °C, 50 seg 72 °C, 5 min 4 °C, mantenido } 35 ciclos

Para optimizar al máximo el rendimiento de la recombinación LR, los vectores Gateway[®] contienen entre los dos sitios *att*, además de un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (CmR), el gen *ccd* que permite una selección negativa del *Destination vector* en *E. coli* siempre que la recombinación haya transcurrido adecuadamente. La proteína *CcdB* interfiere con la ADN girasa de *E. coli* inhibiendo así el crecimiento de la mayoría de sus cepas (por ejemplo, DH5 α [™], TOP10) (Bernard y Couturier, 1992). Cuando se produce la recombinación LR entre el *Entryvector* y el *Destination vector*, el cassette que contiene al gen *ccdB* es reemplazado por el gen de interés generando así el vector de expresión.

La selección del vector de expresión obtenido (pFRN-*gen*) se realiza en células de *E. coli* carentes del episoma F' y en presencia de kanamicina, seleccionando así solamente aquellas células que incorporan un vector carente del gen *ccdB* y con resistencia a kanamicina.

II.9.1.1. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen[™])

El vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen[™]) se empleó como *Entry vector* para el subclonaje de productos de PCR procedentes de la amplificación de una región previamente seleccionada correspondiente a un fragmento de la secuencia codificante del gen *FaRGlyase1*. Posteriormente y de manera independiente, el fragmento amplificado fue transferido desde el vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] mediante recombinación de las regiones *att* al vector binario pFRN mediante la metodología *Gateway[®]* (Invitrogen[™]) (*Materiales y Métodos, apartado II.10*). Obtuvimos así el vector de silenciamiento mediante ARN interferente que se empleó para el silenciamiento de dichos genes en plantas de fresa.

Apéndice 16: Poliadenilación	
Mezcla de reacción de poliadenilación	Programa utilizado
10X PCR 5 µl Cl ₂ Mg (50 mM) 1,5 µl dATP (2 mM) 1 µl <i>DNA polimerasa</i> 1 µl ADN 27 µl H ₂ O 14,5 µl	72 °C, 20 min

El subclonaje de los fragmentos generados por PCR dentro del vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] se realizó siempre siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La mezcla de reacción empleada, así como el programa de PCR utilizado se recogen en *Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2*. Rutinariamente, tras una purificación previa del fragmento de PCR generado, al programa general de PCR se le adicionó un paso de poliadenilación a 72 °C de 30 minutos de duración (*Materiales y Métodos, apéndice 16*) para asegurar la presencia de un residuo de desoxiadenosina protuberante en el extremo 3', residuo imprescindible para el subclonaje del amplicón obtenido dentro del vector pCR[®]8/GW/TOPO[®]. En cualquier caso, la amplificación del fragmento de ADN correspondiente a *FaRGlyase1*, se realizó empleando oligonucleótidos diseñados específicamente para dichos genes.

Tras la poliadenilación, se procedió de nuevo a la purificación del producto de PCR obtenido con el kit *FavorPrep[™] GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez determinada la concentración del ADN recuperado mediante espectrofotometría (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1.*), se procedió a su subclonaje dentro el vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] utilizando la mezcla de reacción que se detalla en el *Apéndice 21* e incubando la misma durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a la transformación de una alícuota de células competentes *One Shot[®] TOP10*

Chemically Competent E. coli (Invitrogen™) empleando 2-6 µl de la mezcla de reacción (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*).

Apéndice 17: Obtención del ADN copia completo (“full-length”) flanqueado por sitios de restricción	
Mezcla de reacción de PCR	Programa utilizado
5X iProofHF Buffer 10 µl dNTPs (5 mM) 2 µl NCED1-prot-fw* (2 µM) 12,5 µl NCED1-prot-rv* (2 µM) 12,5 µl <i>iProof DNA polimerasa</i> 0,5 µl ADNc 2 µl H ₂ O 10,5 µl	98 °C, 1 min 98 °C, 10 seg 55 °C, 30 seg 72 °C, 50 seg 72 °C, 5 min 4 °C, mantenido } 35 ciclos

Apéndice 18: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen™)	
Amplicón purificado	2 µl
Solución salina (Invitrogen™)	1 µl
H ₂ O milliQ	2 µl
pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen™)	1 µl

II.9.1.2. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pFRN mediante la reacción *LR clonasa Gateway* (Invitrogen™)

Una vez generados los *Entry vector* pCR®8/GW/TOPO® conteniendo el fragmento de ADN correspondiente, se procedió a su transferencia por recombinación al vector binario pFRN en una reacción mediada por la *LR clonasa Gateway* (Invitrogen™).

La recombinación se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción y adicionando los reactivos en el orden indicado:

pCR®8/GW/TOPO®:: <i>inserto</i> (300 ng)	1-10 µl
pFRN (300 ng)	2 µl
Tampón de reacción de la LR Clonasa [5X]	4 µl
Tampón TE pH 8	hasta 16 µl
<i>LR Clonase enzyme mix</i>	4 µl

La mezcla se incubó a 25 °C durante 16 horas y, transcurrido este periodo, se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos en presencia de 2 µl de *Proteinasa K*. A continuación,

se procedió a la transformación de una alícuota de células competentes *One Shot*[®]TOP10 *Chemically Competent E. coli* (Invitrogen[™]) con 5 µl de la reacción LR como se describe en *Materiales y Métodos, apartado II.4.2.*

II.9.2. Principios básicos de la transformación genética mediada por *Agrobacterium*

Uno de los métodos más extendidos para la transformación genética de plantas es el empleo de *Agrobacterium* como vector biológico portador del ADN que será transferido a la planta. Esta metodología se basa en la condición natural que posee esta bacteria para insertar genes de manera estable en una célula vegetal. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria Gram-negativa del suelo que produce la enfermedad de “agalla de corona” en una amplio rango de especies de plantas dicotiledóneas. Esta enfermedad se produce por la infección de *Agrobacterium* a través de heridas preexistentes. Así, la bacteria responde con quimiotactismo positivo a las moléculas de naturaleza fenólica que la planta libera al sufrir una herida. La utilización de esta bacteria como vector ha sido posible gracias a la eliminación mediante ingeniería genética de los genes responsables de la formación del tumor, dejando intacto el resto de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de colonización (Hoekema *et al.*, 1983; Potrykus, 1991; Hooyakaas y Beijersbergen, 1994; Christie, 1997; de la Riva *et al.*, 1998; Gelvin, 2003).

En el plásmido binario desarmado contenido en *Agrobacterium*, se sitúa la región denominada T-DNA (*Transfer DNA*), que es la porción de ADN de dicho plásmido que será integrada en el genoma de la planta. En este fragmento de ADN, se localiza un gen de selección (resistencia a antibióticos, herbicidas, etc.), así como el fragmento de interés correspondiente al gen que se desea integrar en la planta. En estas construcciones, los genes están incluidos en casetes que contienen promotores y terminadores reconocibles por la célula vegetal y que son necesarios para la expresión de los genes introducidos. Además, el T-DNA está delimitado por los extremos derecho (RB, *right border*) e izquierdo (LB, *left border*), imprescindibles para la transferencia de éste desde el plásmido binario al genoma de la planta (Caballero *et al.*, 2001).

La metodología de transformación mediada por *Agrobacterium* consiste básicamente en la incubación del explanto vegetal (protoplastos, discos de hoja, callos embriogénicos, etc) con un cultivo de la bacteria que porta el plásmido adecuado. Para aumentar el número de células del explanto competentes para la infección y posterior regeneración, el explanto se somete a daño físico produciéndole heridas que lo predisponen a la infección con *Agrobacterium* y a la incorporación del T-DNA. Este proceso se denomina *inducción*. Tras la *infección*, se realiza un *cocultivo* del explanto con la bacteria en medio no selectivo para permitir la expresión de los genes foráneos en las células vegetales que hayan incorporado el T-DNA. Finalmente, de

manera simultánea se realiza la *selección* de las células transformadas y la eliminación de *Agrobacterium* en medio selectivo suplementado con los antibióticos adecuados, (El Mansouri *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 2001).

II.9.3. Transformación estable de plantas de *Fragaria × ananassa* “Chandler”

II.9.3.1. Obtención y mantenimiento de plántulas de *Fragaria × ananassa* “Chandler” *in vitro*.

Las plántulas de *Fragaria × ananassa* “Chandler” empleadas en este trabajo fueron cedidas por el Dr. F. Pliego Alfaro (Universidad de Málaga) y se obtuvieron mediante la regeneración de ápices caulinares (López-Aranda *et al.*, 1994; El Mansouri *et al.*, 1997). Las plántulas se mantuvieron en medio de multiplicación durante cuatro semanas antes de ser subcultivadas (*Materiales y Métodos*, apéndice 19). En cada subcultivo, siempre se eliminaron las raíces y se separaron las plántulas aparecidas en yemas axiales que se usaron para multiplicar el *stock* de plántulas. En general, las plántulas se crecieron con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad, con una irradiación de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lámparas Sylvania Gro-lux), y con una humedad relativa en el interior de la cámara de 60-70% (El Mansouri *et al.*, 1997).

II.9.3.2. Transformación de plantas de *Fragaria × ananassa* “Chandler” mediante infección con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*.

La transformación de *Fragaria × ananassa* “Chandler” mediada por *A. tumefaciens* se llevó a cabo según el método descrito por Barceló *et al.* (1998), que adaptó a fresa la técnica de transformación previamente descrita por Horsch *et al.* (1985).

El proceso de transformación consta de cuatro fases diferenciadas:

- **Precultivo.** Durante esta etapa se obtuvieron los explantos foliares a usar posteriormente en el proceso de transformación. Para ello, a partir de plántulas *in vitro* de 3-5 semanas de edad, se seleccionaron hojas trifoliadas jóvenes, de mayor potencial regenerativo (Raviv *et al.*, 1987), que se cortaron en secciones de 5 mm². Los explantos obtenidos se colocaron, siempre con el haz hacia abajo, en placas de Petri con medio de organogénesis (*Materiales y Métodos*, apéndice 19). El precultivo se mantuvo durante 8 días a 25 °C y siempre en oscuridad para reducir la exudación fenólica y favorecer la morfogénesis de los explantos (Liu y Standford, 1988; George, 1993; Barceló *et al.*, 1998).

- **Infección.** Durante esta etapa, los explantos foliares obtenidos en la etapa anterior fueron infectados con el cultivo de *Agrobacterium* LBA4404 portador del vector binario que contenía nuestra construcción de interés. Para ello, inicialmente se cultivó la estirpe de *Agrobacterium* portadora de nuestra construcción en 5 ml de medio LB líquido suplementado con rifampicina (100 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) a 28 °C y 200 rpm durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se refrescaron varios cultivos empleando como inóculo 200 µl del cultivo anterior. En esta ocasión, los cultivos se crecieron en 5 ml de medio LB líquido (pH 5,4) suplementado con los antibióticos anteriores y con acetosiringona (100 µM), un compuesto de naturaleza fenólica que incrementa la virulencia de *Agrobacterium*, y se incubaron a 28 °C y 200 rpm durante 16 h. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ entre 0.6-1 unidades, los cultivos se diluyeron con H₂O hasta ajustar su DO₆₀₀ a 0.2 en un volumen final de 50 ml y se procedió a la infección propiamente dicha. Así, a cada uno de los cultivos diluidos se les añadió ~40 explantos de hoja (una vez finalizado el precultivo), que se mantuvieron sumergidos en la solución mediante agitación suave durante 20 minutos. Finalmente, los explantos se recogieron y se secaron sobre dos papeles secantes estériles para eliminar el exceso de medio de cultivo e, inmediatamente después, se dispusieron nuevamente sobre medio de organogénesis manteniendo el haz en contacto con éste.
- **Cocultivo.** Durante esta etapa, los explantos infectados se mantuvieron durante 2 días en ausencia de antibióticos de selección en medio de organogénesis a 25 °C y en oscuridad en una cámara de cultivo.
- **Selección.** Terminado el periodo de cocultivo, durante esta etapa, los explantos se subcultivaron durante 4 días a 25 °C y en oscuridad en nuevo medio de organogénesis suplementado con carbenicilina (500 mg/l), para eliminar a *Agrobacterium*, y kanamicina (25 mg/l), para seleccionar los explantos transformados. Transcurrido este tiempo, los explantos se mantuvieron con un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad a 25 °C en la cámara de cultivo. Durante el periodo de organogénesis y regeneración, que puede variar entre 4 y 6 meses dependiendo de la construcción transformada, los explantos se subcultivaron a nuevo medio de organogénesis selectivo cada 4 semanas. Tras cuatro subcultivos, la concentración de carbenicilina añadida al medio se redujo a 250 mg/l, retirándose completamente en el sexto subcultivo. Simultáneamente, en el cuarto subcultivo, la concentración de kanamicina se incrementó hasta 50-100 mg/l para reducir los eventos de transformación con inestabilidad genética (Houde *et al.*, 2004). Cuando aparecieron plántulas de 2 cm de

longitud, éstas se aislaron del resto del explanto y se subcultivaron en medio de multiplicación suplementado con kinetina (0,47 mg/l) y con el antibiótico correspondiente, generalmente kanamicina (100 mg/l). Cada planta obtenida a partir de un explanto se consideró un evento independiente de transformación.

II.9.3.3. Aclimatación y multiplicación de las plantas transgénicas

Se aclimató una única plántula crecida en medio de multiplicación suplementado con kanamicina (100 mg/l) por cada evento independiente de transformación. Siempre se sembraron en macetas de 250 ml con turba y arena (1:1). Las plantas seleccionadas, que siempre tuvieron un sistema radicular bien desarrollado, se extrajeron del medio de cultivo y sus raíces se lavaron con agua abundante para eliminar restos de medio y evitar contaminaciones. A continuación, las raíces se introdujeron en la turba humedecida y, para mantener una humedad elevada, la maceta se cubrió con una bolsa de plástico transparente. Las macetas se mantuvieron a temperatura ambiente con iluminación natural y siempre humedecida. La aclimatación de la planta se realizó mediante la realización de una abertura de ~1 cm en la bolsa cada dos días hasta retirarla completamente.

Las plantas transgénicas portadoras de la construcción pFRN-*FaRGlyase1* fueron generadas tanto en la Universidad de Córdoba (UCO) como en la Universidad de Málaga (UMA) por el grupo del Dr. Fernando Pliego.

Una vez finalizada la aclimatación, las plántulas se multiplicaron mediante propagación vegetativa en invernaderos del CIFA de Churriana (Málaga). La temperatura, humedad y fotoperiodo del invernadero fueron las ambientales. Cuando fue necesario, las plantas se abonaron y fueron sometidas a distintos tratamientos fitosanitarios.

II.9.3.4. Selección y análisis de plantas transgénicas

La primera selección de las plantas transgénicas se realizó a nivel fenotípico en base a su resistencia frente a kanamicina. Así, todos los explantos resistentes a kanamicina que mostraron un aspecto sano y proliferación de microcallos, se subcultivaron periódicamente manteniendo la presión de selección hasta la generación de plántulas. Cuando éstas presentaron un tamaño suficiente, se crecieron en medio de multiplicación suplementado con kinetina (0,47 mg/l) y kanamicina (100 mg/l) y, posteriormente, fueron trasvasadas a maceta. Este periodo tuvo una duración aproximada de 6-8 meses. Por otro lado, las plántulas necrosadas, etioladas o deformes fueron desechadas.

Apéndice 19: Medios y soluciones empleadas en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fragaria* × *ananassa* “Chandler”.**Medio LB** (Apéndice 1)**Acetosiringona** (100 mM)

19,6 mg/ml en EtOH 70%. Almacenar a 4 °C

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para *Fragaria* × *ananassa* “Chandler”*Sales minerales*NH₄NO₃ 0,47 g/lKNO₃ 1,31 g/lMgSO₄×7H₂O 0,24 g/lKH₂PO₄ 0,13 g/l

KCl 0,074 g/l

Ca(NO₃)₂×4H₂O 0,59 g/l

NaFe-EDTA 10 ml/l

(de una solución compuesta por:

3,724 g/l de Na₂EDTA Titriplex2,78 g/l de FeSO₄)*Micronutrientes*

Añadir 10 ml/l de una solución compuesta por:

MnSO₄×H₂O 1,690 g/lZnSO₄×7H₂O 0,860 g/lCuSO₄×5H₂O 0,0025 g/l

KI 0,0830 g/l

CoCl₂×6H₂O 0,0025 g/lH₃BO₃ 0,620 g/lNa₂MoO₄×2H₂O 0,025 g/l*Stock de vitaminas*

Añadir 10 ml/l de una solución compuesta por:

Tiamina×HCl 0,1 g/ml

Piridoxina×HCl 0,05 g/ml

Ácido nicotínico 0,05 g/ml

Glicina 0,2 g/ml

Otros componentes

Sacarosa 20 g/l

Myo-Inositol 100 mrg/l

Agar de plantas 7 g/l

Medio MS de organogénesis

Añadir al medio MS las hormonas:

Ácido Indol-3-butírico (IBA) 0,5 mg/l

6-bencil aminopurina (BA) 2 mg/l

Medio MS de multiplicación

Añadir al medio MS la hormona:

Kinetina 0,47 mg/l

Otros componentes

Sacarosa 20 g/l

Myo-Inositol 100 mg/l

Agar de plantas 7 g/l

Las hormonas se prepararon a una concentración de almacenamiento de 0,1 mg/l. Para disolverlas, se añadieron unas gotas de NaOH 1N hasta su disolución y luego se completó el volumen con H₂O destilada.

Los antibióticos se añadieron al medio estéril templado antes de solidificar. Posteriormente, éste se distribuyó en frascos previamente esterilizados.

Las plantas que presentaron resistencia a kanamicina fueron analizadas posteriormente mediante PCR para comprobar su naturaleza transgénica. Para ello, se empleó el kit *Phire Plant Direct PCR Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. De las plantas transgénicas confirmadas, se extrajo ARN y mediante qRT-PCR se determinó el grado de sobreexpresión del trasgén correspondiente en cada una de ellas (*Materiales y Métodos, apartado II.6.3*). En el caso del silenciamiento del gen *FaRGlyase1*, se seleccionaron aquellas

líneas transgénicas que presentaron mayor grado de silenciamiento del gen acompañado de un fenotipo más evidente para su posterior análisis.

II.9.4. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta”.

II.9.4.1. Obtención y mantenimiento de plantas de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta”

El cultivar *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” se empleó para la transformación de frutos de fresa mediante agroinfiltración. Las plantas se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y bajo una irradiancia de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ proporcionada por lámparas Osram Fuora (München, Germany).

II.9.4.2. Transformación transitoria de frutos de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” a través de agroinfiltración con *A. tumefaciens* AGL0

La transformación de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” mediada por *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo *et al.*, 1991) se llevó a cabo según el método descrito previamente por Hoffmann *et al.* (2006), que adecuó la técnica de transformación previamente descrita por Spolaore *et al.* (2001) a esta especie.

La estirpe AGL0 de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones pFRN-*FaNCED1*, pFRN-*FaRGlyase1*, pFRN-*FaDOF2*, pFRN-*FaMYB10* y pFRN-*FaBOPI* independientemente, fue cultivada a 28 °C en 50 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Cuando el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600} \sim 0.8$, las células de *Agrobacterium* fueron recolectadas mediante centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y, posteriormente, resuspendidas en 10 ml de medio agar MacConkey modificado (MMA) (*Materiales y Métodos, apéndice 24*) (Spolaore *et al.*, 2001). A continuación, esta suspensión celular se inyectó en frutos en un estadio intermedio entre verde y blanco, generalmente alcanzado 14 días después de la polinización. La suspensión se inyectó uniformemente en el fruto usando una jeringuilla hipodérmica estéril de 2 ml y procurando pinchar una o dos veces solamente para evitar dañar el fruto en exceso. Tras la inyección, las plantas se dejaron nuevamente en la cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas previamente. Aunque se hizo un seguimiento diario de la evolución de los frutos inyectados para comprobar la existencia o no de cambios fenotípicos evidentes, los frutos no se recolectaron hasta 14 días después de la inyección (estadio rojo). En paralelo y de forma simultánea, también se inyectaron frutos con un cultivo de la cepa AGL0 de *A. tumefaciens* sin transformar (control). En cualquier caso, los frutos inyectados, una vez recolectados, se

congelaron a -80 °C hasta su uso. Paralelamente, se hizo lo mismo con la estirpe utilizada como control positivo que contenía la construcción pBI-Intrón (Hoffmann *et al.*, 2006). Como control negativo se utilizaron frutos inyectados con el plasmido vacío pFRN.

Apéndice 20: Medios y soluciones empleadas en la transformación transitoria de *Fragaria × ananassa* "Elsanta" con *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0

Medio Luria-Bertani (Apéndice 1)

Medio MMA (Spolaore *et al.*, 2001)

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Apéndice 19)

10 mmol l⁻¹ MES (ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico) a pH 5,6

20 g l⁻¹ de Sacarosa

200 µmol l⁻¹ de Acetosiringona

II.9.4.3. Análisis de frutos transgénicos

El grado de silenciamiento de los genes en estudio (*FaRGlyase1*, *FaDOF2*, *FaBOPI*) se determinó mediante qRT-PCR en los frutos transgénicos obtenidos en las diferentes transformaciones realizadas. En el caso de los frutos transgénicos pFRN-*FaDOF2* también se realizaron extracciones de volátiles que posteriormente fueron analizados mediante GC-MS. En el caso de los frutos transgénicos pFRN-*FaBOPI* también se realizaron extracciones de metabolitos que posteriormente fueron analizados mediante GC-MS y LC-MS, con los frutos transgénicos pFRN-*FaNCE1* se realizaron extracciones de ABA que posteriormente fueron analizadas mediante HPLC-MS (*Materiales y Métodos, apartado II.9.3*). En el caso de los genes *FaDOF2*, y *FaBOPI*, de entre todos los frutos agroinfiltrados se seleccionaron aquellos que presentaron un grado de silenciamiento superior al 95% para un análisis transcriptómico detallado mediante microarray.

II.9.5. Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* a través de agroinfiltración con *A. tumefaciens* GV3101.

La localización subcelular de la expresión transitoria de los genes en estudio se llevó a cabo con construcciones derivadas del vector binario pK7WGF2.0 (*Materiales y métodos, apartado I.2.6*), el cual permite la fusión de la proteína GFP en el extremo amino terminal de la proteína en estudio.

Las secuencias completas de los ADNc de los genes *FaNIP1;1*, *FaDOF2* y *FaBOP1* de fresa fueron amplificadas por PCR usando cebadores específicos para cada gen (*attB-NIP1;1 attB-DOF2* y *attB-FABOP1*), con los sitios *attB1* y *attB2* acoplados. Tras la amplificación, se procedió a la purificación del producto de PCR obtenido empleando el *kit* comercial *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen) y a su cuantificación por espectrofotometría (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1.*). Entonces, el amplicón purificado fue clonado mediante una reacción BP clonasa (*Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix* (Invitrogen™) en el entry vector pDONR™221 (Invitrogen™) (*Materiales y Métodos, apartado I.2.4.*) utilizando la mezcla de reacción detallada en el *Apéndice 25* e incubando la misma durante toda la noche a 25 °C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, se procedió a la transformación de una alícuota de células competentes *One Shot®TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen™) con 2-6 µl de la mezcla de reacción (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2.*).

Apéndice 21: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pDONR™221 (Invitrogen™)

Amplicón purificado (producto <i>attB-PCR</i>) ~ 75 ng	1-7 µl
pDONR™221 (Invitrogen™) (150 ng/µl)	1 µl
Tampón TE pH 8	hasta 8 µl
<i>BP clonase enzyme mixII</i> 2 µl	

Una vez generado el *Entry vector* pDONR™221conteniendo independientemente el fragmento de ADNc correspondiente a los genes *FaNIP1;1*, *FaDOF2* y *FaBOP1*, se procedió a su transferencia al vector binario pK7WGF2.0 mediante la recombinación mediada por la *LR clonasa Gateway* (Invitrogen™). El resultado fue una construcción de fusión 35S::GFP::Gen. La recombinación se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción y adicionando los reactivos en el orden indicado:

pDONR™221-ADNc (300 ng)	1-10 µl
pK7WGF2.0 (300 ng)	2 µl
Tampón de reacción de la LR Clonasa [5X]	4 µl
Tampón TE pH 8	hasta 16 µl
<i>LR Clonase enzyme mix</i>	4 µl

La mezcla se incubó a 25 °C durante 16 horas y, transcurrido este periodo, se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos en presencia de 2 µl de *Proteinasa K*. A continuación, se procedió a la transformación con 5 µl del total de la reacción de una alícuota de células

competentes *One Library Efficiency DH5α Chemically Competent Cells* (Invitrogen™) como se describe en *Materiales y métodos, apartado II.4.2.*

Las construcciones generadas fueron testadas mediante secuenciación (*Materiales y Métodos, apartado II.3.6.*) antes de llevar a cabo la transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 (Weigel *et al.*, 2006) conteniendo independientemente las construcciones pK7WGF2-*FaNIP1;1*, pK7WGF2-*FaDOF2* y pK7WGF2-*FaBOP1*, y el vector vacío pK7WGF2 (usado como control); y cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 transportando el vector supresor de genes de silenciamiento pTBSV-*p19* (Voinnet *et al.*, 2003) fueron crecidos a 28 °C en medio LB con los antibióticos apropiados hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 0,8$. Las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en tampón de infiltración (10 mM $MgSO_4$, 10 mM MES and 1 mM acetosiringona) ajustando su concentración final entre 0,5 y 0,8. Las suspensiones con las construcciones de interés y los plásmidos vacíos fueron mezcladas con las células que contenían el vector pTBSV-*p19* a partes iguales e incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente entre 2 y 4 horas. Transcurrido este tiempo, las suspensiones bacterianas fueron infiltradas de forma independiente a través de la cara abaxial de la hoja con una jeringa sin aguja. Las hojas infiltradas fueron recolectadas cuatro días después de su inyección. Para la localización de los núcleos celulares de manera precisa, pequeños fragmentos de hojas de *N. benthamiana* fueron incubados en oscuridad con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) durante 5 minutos y lavados luego con agua destilada. Estos fragmentos de hoja tratados fueron observados para la localización de la proteína GFP con un microscopio de epifluorescencia LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss, Inc., Germany). Los parámetros de excitación/emisión usados para la visualizar la fluorescencia de la proteína GFP y el DAPI fueron de 488/500–515 nm y 405/449–461 nm respectivamente.

DAPI es una tinción fluorescente que emite fluorescencia azul tras su unión selectiva al surco menor del ADN de doble cadena. Este compuesto se une fuertemente a las regiones de ADN ricas en A-T donde su fluorescencia es aproximadamente 20 veces mayor que en estado libre. Su selectividad de unión alADN y su alta permeabilidad permite la tinción de núcleos celulares con poco ruido de fondo del citoplasma. DAPI es una tinción nuclear clásica usada enmicroscopía de inmunofluorescencia.

II.10. Interacción mediante doble híbrido en levadura

Enel estudio de doble híbrido de levadura, el marco abierto de lectura de los genes *FaDOF2*, *FaEOBII*, *FaBOP1* y *FaMYB10*, subclonados en el vector pDONR™221, fueron recombinados

mediante una reacción LR GatewayTM en los vectores “bait” pBDGAL4 (pDESTTM32; InvitrogenTM), y “prey” pADGAL4 (pDESTTM22; InvitrogenTM), independientemente (*Materiales y Métodos. Apartado II.10*) (cedidos por cortesía del Dr. Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). Los vectores “bait” y “prey” resultantes fueron transformados en las cepas de levadura PJ69-4a (*MATa*) y PJ69-4a (*MATa*) respectivamente según describe James *et al.* (1996); y usados en los experimentos de doble híbrido de levadura tal y como describe Folter *et al.* (2005). Las levaduras transformantes obtenidas fueron seleccionadas en placas con medio SD (*Materiales y Métodos, apartado I.2.3.1, apéndice 2 y 3*) en ausencia de triptófano y leucina, respectivamente, y comprobadas por PCR con cebadores específicos.

II.10.1 Ensayos de auto-activación

Antes de llevar a cabo el ensayo del doble híbrido de levadura, la cepa de levadura que contiene la construcción con nuestro gen de interés (“cebo”) debe ser examinada mediante ensayos de auto-activación. La auto-activación se define como la activación detectable de un gen reportero presente en la construcción “cebo” en ausencia de cualquier interacción con la “presa”. Las interacciones de fuerza débil a intermedia en los ensayos de auto-activación se aceptan como ruido de fondo, ya que las interacciones “cebo-presa” específicas confieren uniones más fuertes que las auto-activaciones. Si el gen reportero que se emplea es HIS3, el ruido de fondo de la auto-activación puede ser suprimido mediante la adición de 3-AT en el medio de selección de crecimiento de las levaduras. El 3-AT es un inhibidor competitivo de HIS3.

Los ensayos de auto-activación de todos los “cebos” objeto de estudio deben ser llevados a cabo de forma simultánea en placas que contengan diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). Por ejemplo, se pueden utilizar una serie de titulación con concentraciones de 3-AT desde 0, 1, 2, 4, 8, 16...hasta 128 mM. La concentración más baja (concentración inhibitoria mínima) de 3-AT que suprime el crecimiento en esta prueba se utiliza para los posteriores ensayos de interacción del doble híbrido de levadura, ya que evita el ruido de fondo del crecimiento de las autoactivaciones, mientras que las verdaderas interacciones siguen siendo detectables.

II.10.2. Identificación de transformantes diploides positivos de levadura

De las colonias de levaduras diploides crecidas en medio selectivo y en las que se establecen interacciones “cebo-presa”, las secuencias de las respectivas “presas” se pueden obtener mediante PCR de dichas colonias. Así, la PCR se realizó con los cebadores PRO500 (5'-GCG

TTT GGA ATC ACT ACA GG -3') y PRO501 (5'- AAC CTC TGG CGA AGT AGA CC -3') (*Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2.; Tabla 3*) diseñados sobre el vector pDESTTM22. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron identificadas mediante BLAST a través de los servidores del NCBI y www.strawberrygenome.org.

II.11. Purificación de proteínas y determinación de motivos de unión al ADN

El ensayo de determinación de motivos de unión al ADN fue llevado a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (UG-CNB) bajo la supervisión del Dr. José M. Franco-Zorrilla.

La construcción para obtener fusiones traduccionales de la proteína de interés FaEOBII con la proteína de unión a la maltosa (MBP), se obtuvo clonando la secuencia codificante completa del factor de transcripción FaDOF2 pDEST-TH1 (cedido por Dr. José M. Franco-Zorrilla y Dr. Roberto Solano del Centro Nacional de Biotecnología; CNB-CSIC) mediante una reacción de recombinación de tipo LR GatewayTM. El fragmento de interés se obtuvo mediante PCR empleando los cebadores específicos attB-DOF2 y se subclonó en el vector pDONRTM221. La construcción recombinante obtenida se comprobó mediante PCR y secuenciación y, posteriormente, se introdujo en la cepa BL-21 de *E. coli*. La expresión y purificación de la proteína recombinante MBP::FaDOF2 se realizó como describe el protocolo del sistema de purificación pMAL (New England Biolabs). Los motivos de unión a ADN del factor de transcripción FaDOF2 fueron determinados empleando una plataforma de microarray de proteínas de unión a secuencias cis-reguladoras (PBM11) como describe Godoy *et al.* (2011). De forma resumida, se incubó 1 mg de proteína recombinante durante 2.5 h a temperatura ambiente con un microarray de secuencias de ADN de doble cadena que contenía todas las combinaciones posibles de secuencias de 11-pb (~4.2 millones de secuencias) ordenadas en ~240000 puntos. Después de sucesivos lavados, el microarray fue incubado con un anticuerpo primario anti-MBP y con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (DyLight 549). Finalmente, los cristales fueron escaneados a 5 mm en un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) y las intensidades de las señales captadas fueron cuantificadas con el programa GenePix Pro 5.1. Todos los pasos llevados a cabo (síntesis *in situ* de la doble cadena de ADN, incubaciones, lavados de la proteína recombinante y anticuerpos, escaneado, cuantificación y determinación de los motivos de unión a ADN) fueron realizados según describe Godoy *et al.* (2011).

Apéndice 22: Soluciones empleadas para la inducción y purificación de la proteína recombinante	
Medio LB (Apéndice 1)	Tampón de reconstitución [10X] pH 8 Tris-HCl 500 mM
Tampón de lavado [10X] pH 7,3 Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O 43 mM KH ₂ PO ₄ 14,7 mM NaCl 1,37 M KCl 27 mM	
	Tampón de elución [1X] Tampón de reconstitución [1X] + Glutación 10 mM

Apéndice 23 Soluciones empleadas para la electroforesis de geles de poliacrilamida	
Tampón Tris/Glicina [10X] (no es necesario ajustar el pH) Tris-Base 0.25 M Glicina 1.92 M Hasta 1 l con H ₂ O MQ	
Soluciones empleadas para la coloración/decoloración de geles de poliacrilamida	
Solución de tinción 0,33 g Azul de Coomassie G250 en 120 ml Metanol 24 ml Ácido acético 120 ml H ₂ O	Solución de lavado 7 % Ácido acético 10 % Metanol

II.12. Ensayos histológicos

II.12.1. Recolección y fijación del material biológico

El material biológico empleado fueron frutos completos (receptáculos + aquenios) agroinyectados con en *Agrobacterium* portador de la construcción pFRN-*FaRGLyase1*, o del vector pFRN vacío en el caso de los controles, y se recogieron “*in situ*” en la cámara de cultivo a partir de plantas de fresa (*Fragaria × ananassa* “Chandler”). La muestra se separó de la planta con unas tijeras y posteriormente se dividió con un bisturí estéril en secciones longitudinales y transversales lo más pequeñas posible dependiendo del tejido.

Para las muestras empleadas en el análisis histológico mediante microcopía óptica, las secciones obtenidas se introdujeron inmediatamente en un tubo de 50 ml conteniendo el fijador Bouin (ácido pícrico saturado 75 % (v/v), formaldehído 25 % (v/v) y ácido acético glacial 0.05 % (v/v)), y glutaraldehído al 2% en tampón fostato pH 7, para las muestras empleadas en microscopía electrónica. Las muestras fijadas en Bouin se mantuvieron en el fijador entre 12 y 24 horas como máximo. Cuando se observó que la penetración del fijador en los tejidos no fue la adecuada, hecho que se manifiesta porque los mismos flotan en la solución, el tubo con el fijador y las muestras fue introducido en una campana de vacío para desgasear los tejidos y favorecer la penetración del fijador. Cuando el fijador empleado fue glutaraldehído, el tiempo

de fijación de las muestras fue de 24 h y fue necesario desgasear los tejidos para facilitar la penetración del fijador en ellos

II.12.2. Inclusión en parafina

Los tejidos empleados en microscopía óptica se incluyeron en parafina (Paraplast Plus; Sherwood Medical) después de ser sometidos a una fase de deshidratación e inclusión progresiva.

La deshidratación de las muestras se realizó de forma progresiva a lo largo de dos días. Inicialmente, éstas se introdujeron sucesivamente durante 20 minutos cada vez en alcohol al 30% y 50% a 4 °C. Inmediatamente después, las muestras se dejaron durante 12 horas en etanol al 70% a 4 °C. Transcurrido este tiempo, los tejidos se volvieron a sumergir sucesivamente durante 20 minutos cada vez en etanol al 85%, 90%, 100% y 100% a temperatura ambiente.

Terminada la deshidratación, las muestras se transfirieron a una mezcla de etanol y butanol terciario en las siguientes relaciones: 3:1, 1:1 y 1:3, durante 30 minutos cada vez y a temperatura ambiente. Seguidamente, el material se introdujo exclusivamente en butanol terciario al 100% durante 30 minutos a 30 °C.

A continuación, los tejidos se fueron incluyendo progresivamente en una mezcla de butanol terciario y parafina en una mezcla de butanol terciario saturado con parafina a 30 °C durante 4-6 horas a 30 °C y, finalmente, en butanol terciario saturado con parafina a 42 °C durante 12 horas. El progresivo aumento de la temperatura favoreció la infiltración de los tejidos fijados con parafina.

Llegados a este punto, y para eliminar cualquier resto de butanol terciario presente en los tejidos, se dieron al menos cuatro pasos sucesivos en parafina a 60 °C para favorecer la evaporación. El primer paso por parafina fue de tres días de duración y los siguientes de 24 horas.

II.12.3. Inclusión en la resina epoxi Epon

Este tipo de inclusión se llevó a cabo con muestras que iban a ser empleadas en microscopía electrónica o para la obtención de cortes semifinos (0,5-1 µm de grosor). En este caso, el medio de inclusión empleado fue la resina epoxi Epon.

Una vez fijados los tejidos, éstos se lavaron dos veces, 30 minutos cada vez, en agua destilada. A continuación, la mitad de las muestras de cada tejido se trataron con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% (v/v) en solución acuosa durante 2 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras tratadas con tetróxido de osmio se lavaron dos veces con agua destilada, 30 minutos cada vez, y posteriormente teñidas con acetato de uranilo al 3% durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se deshidrataron tratándolas en una serie creciente de acetona (50, 70, 90 y 100%) durante 30 minutos en cada tratamiento. A continuación, los tejidos se embebieron en resina Epon. La resina polimerizó a 65 °C durante 24°.

II.12.4. Obtención de bloques y cortes histológicos

Los tejidos incluidos en parafina se individualizaron en bloques independientes. Para ello, se aislaron uno a uno sobre moldes metálicos (Miles Inc.) y éstos se dispusieron sobre una placa térmica (“Plactronic” Selecta) a 60 °C. Sobre ellos, se vertió parafina líquida licuada durante varias horas en una estufa a 60 °C, y sobre ella, a su vez, se depositó una rejilla plástica (Miles Inc.) sobre la que se dejó solidificar la parafina lentamente a temperatura ambiente. Cuando se formó una película gruesa de parafina solidificada, el molde se retiró de la placa térmica y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Transcurridos unos 5 minutos, el molde se introdujo sucesivamente a 4 °C durante 10 minutos y a -20 °C durante 20 minutos. Después de este tiempo, el bloque de parafina conteniendo el tejido y el soporte plástico se liberó del molde metálico. Los bloques de parafina se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Las secciones de los tejidos incluidos en parafina se obtuvieron cortando los bloques preparados anteriormente con un microtomo (Leica RM 2025). El grosor de las secciones obtenidas fue de 5 μm . Antes de proceder al corte de cada bloque, éste se mantuvo durante 10 minutos a -20 °C para endurecerlo y favorecer el proceso. Además, fue siempre preciso tallar el bloque previamente en forma de trapecoide con un bisturí, lo que facilitó el corte de las secciones y evitó su rotura.

Por otra parte, los tejidos incluidos en resina *Epon* se individualizaron en bloques de esta misma resina.. Los bloques obtenidos se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso. Las secciones a partir de estos bloques se obtuvieron empleando un ultramicrotomo (Leica-Ultracut R). Dependiendo del grosor que se quisiera obtener se empleó una cuchilla de vidrio o diamante. Así, para cortes semifinos de 0,5-1 μm se empleó una cuchilla de vidrio mientras que para cortes más finos, del orden de 70 nm, se empleó una cuchilla de diamante (Diatome, Suiza). En ambos casos, el bloque, una vez fijado al cabezal, se talló con la cuchilla de vidrio antes de proceder a su corte.

II.12.5. Montaje de los cortes histológicos

Para el montaje de las secciones obtenidas a partir de bloques de parafina, se dispuso una serie de portaobjetos sobre una placa térmica a 42 °C. Sobre ellos se añadió aproximadamente 300 µl de gelatina al 1% (p/v) (el volumen varió dependiendo del tamaño del corte que se empleó en el montaje), y los tejidos cortados previamente se dispusieron sobre dicha solución (dos cortes en cada portaobjeto). Se dejaron transcurrir unos 5 minutos para que los cortes se hidrataran bien y se desplegaran completamente sobre el portaobjetos, e inmediatamente después se retiró la solución de gelatina por inversión y el portaobjetos correspondiente se mantuvo nuevamente sobre la placa a 42 °C durante 10 minutos más. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos se dispusieron verticalmente en una estufa a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, los portaobjetos con los cortes adheridos se retiraron de la estufa y en estas condiciones se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

En el caso de las secciones obtenidas a partir de bloques en la resina *Epon*, los cortes semifinos (5-1 µm) se inmovilizaron en portaobjetos gelatinados y los cortes más finos (70 nm) se depositaron en rejillas de níquel de 3 mm de diámetro para su visualización posterior al microscopio electrónico (Philips CM-10). En ambos casos, los tejidos así preparados se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente hasta su uso posterior.

II.12.6. Contraste de las secciones

Este procedimiento sólo fue necesario para las secciones con un grosor del orden de nanómetros previamente a su visualización al microscopio electrónico. La técnica del contraste se realiza para teñir inespecíficamente estructuras celulares básicas y ciertas macromoléculas.

Las rejillas de níquel con las secciones inmovilizadas se depositaron en contacto con una gota (50 µl) de acetato de uranilo al 5% (p/v), preparado con 24-48 h de antelación, durante 15 minutos. A continuación, se realizó un lavado exhaustivo de las muestras en H₂O destilada en tres lavados consecutivos de 1 minuto de duración cada uno. Inmediatamente después, las rejillas se incubaron sobre una gota de citrato de plomo de Reynolds (50 µl) durante 10 minutos y, después de lavarlas exhaustivamente de nuevo en H₂O destilada, éstas se depositaron sobre papel de filtro y se dejaron secar a temperatura ambiente. Durante todo el proceso, las rejillas se cubrieron con una placa de Petri. Además, los reactivos empleados durante todo el proceso fueron previamente filtrados a través de un filtro de 0,2 µm de poro. Las rejillas de níquel fueron manipuladas siempre con unas pinzas finas antimagnéticas (Dumont, Suiza).

II.12.7. Tinciones histológicas

Todos los tejidos estudiados y sometidos a las diferentes tinciones que se enumeran a continuación fueron visualizados en un microscopio PALM MicroBeam (Zeiss).

II.12.7.1. Tinciones histológicas generales

Tinción con azul de toluidina

La tinción con azul de toluidina (al 1% (p/v) en solución de bórax al 1% (p/v) en H₂O) se empleó generalmente para teñir y comprobar el estado de los cortes de tejidos realizados debido a su capacidad de teñir inespecíficamente cualquier estructura y componente celular.

La tinción se llevó a cabo incubando los tejidos, previamente desparafinados e hidratados, durante 5 minutos a temperatura ambiente. En general, el tiempo de incubación se optimizó en el momento de su uso dependiendo del desarrollo del color en la tinción. Transcurrido el tiempo determinado, las muestras se lavaron abundantemente para eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes, y se montaron empleando Entellan (Merck) como resina de montaje. Cuando la tinción se realizó sobre cortes semifinos de tejidos, la incubación de las muestras con el colorante se realizó durante 2 minutos a 37 °C mientras que el resto del proceso transcurrió igual.

II.12.7.2. Tinciones histológicas de hidratos de carbono

Tinción histológica de pectinas con rojo rutenio

Este tipo de tinción tiñe de forma específica las pectinas presente en los tejidos sometidos a este tratamiento. Para ello, los tejidos previamente se desparafinaron e hidrataron. A continuación, se incubaron en una solución de rojo de rutenio al 1% (p/v) disuelto en agua y sonificado durante 2 minutos.

Los cortes semifinos de tejido se tuvieron en esta solución durante 4 días. Las muestras se lavaron abundantemente para eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes, y se montaron empleando Entellan (Merck) como resina de montaje.

Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS, periodic acid-Schiff)

Este tipo de tinción permite teñir inespecíficamente y localizar físicamente cualquier tipo de hidrato de carbono que forme parte de la composición del tejido sometido a estudio. El anión peryodato es un agente oxidante soluble en H₂O con una alta reactividad por los grupos 1,2-diol mientras que el reactivo de Schiff contiene un compuesto hidrofílico y catiónico derivado de la Fuchsina y sulfito aniónico. El reactivo de Schiff no es un colorante específico de aldehídos sino que la selectividad de la tinción se alcanza mediante su combinación con peryodato. Así, este oxidante reacciona con los grupos 1,2-dioles generando dialdehídos que se colorean en presencia de reactivo de Schiff. El color se consigue al eliminar el sulfito con H₂O y por generación del cromóforo rosa trifenilmetano (Horobin, 1988).

Los tejidos sometidos a esta tinción fueron previamente desparafinados e hidratados y, a continuación, se incubaron con ácido peryódico 1 %-0,8% (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la muestra se lavó generosamente con H₂O destilada durante 5 minutos y se incubó con reactivo de Schiff durante 20 minutos. A continuación, los tejidos se lavaron con H₂O destilada durante 5 minutos nuevamente. Las muestras teñidas se deshidrataron con tratamientos consecutivos de 30-60 segundos en etanol al 90%, 100% y xileno y, posteriormente, se montaron empleando Entellan como resina de montaje.

Paralelamente, cuando la tinción se realizó sobre cortes semifinos incluidos en la resina Epon, no fue necesaria la desparafinación del tejido aunque fue adecuada su hidratación previa. En este caso, el protocolo empleado fue el mismo aunque los tiempos de incubación se aumentaron cuatro veces respecto a los empleados en tejidos incluidos en parafina.

II.13 Ensayos de transporte de agua y solutos en levadura recombinante sobreexpresando el gen *FaNIP1;1*

II.13.1. Clonaje del ADNc completo del gen *FaNIP1;1* en los plásmidos de levaduras pYES2 y pUG35.

La secuencia de ADN copia completa del gen *FaNIP1;1* fue amplificada por PCR de una población de ARN total de fresa usando los oligonucleótidos específicos 5'- GAG AAG GAT CCG CAG CCT TGA CCG TCT TCT G -3' y 5'- CCC TCG AAT TCG GTG AAG AGA AAC AAA GGG GTG A -3'. Estos oligonucleótidos son portadores de las secuencias de los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI en los extremos 5' y 3' del fragmento de PCR, respectivamente. El

fragmento de PCR obtenido se separó en gel de electroforesis y se purificó la banda usando el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega) para secuenciación. El fragmento *FaNIP1;1* fue escindido mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* y clonado en su correspondiente sitio de restricción en los vectores pYES2 (Invitrogen) y pUG35 (cortesía de los Drs. Güldener y Hegemann del Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Alemania). Previamente digeridas con las mismas enzimas de restricción.

II.13.2. Ensayos de crecimiento de las levaduras bajo sustratos atípicos

Los ensayos de crecimiento de las levaduras bajo sustratos atípicos se llevaron a cabo en los laboratorios del Dr. José Ramos (Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba) y de la Dra. Catarina Prista (Instituto Superior de Agronomía, Universidad de Lisboa, Portugal).

Para testar la sensibilidad/tolerancia de la cepa de levadura YSH1172 expresando el gen de fresa *FaNIP1;1*, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento bajo estrés osmótico ejercido por concentraciones osmo-equivalentes de KCl y sorbitol; el posible efecto de sustratos atípicos (diferentes del agua) como el boro (ácido bórico), glicerol, y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) también fueron evaluados. Los ensayos de crecimiento se llevaron a cabo en medio YNB sólido suplementado con galactosa al 2% con varias concentraciones de los sustratos anteriormente mencionados. Como fuente de carbono se usó glucosa al 2% en los experimentos llevados a cabo con el vector pUG35. Inicialmente, las cepas fueron crecidas en medio YNB líquido, con una agitación orbital y a 28 °C hasta alcanzar una DO_{640nm} 1.0, correspondiente a 1x10⁷ células/ml. Se prepararon placas de 96 pocillos con diluciones seriadas 1:10 del cultivo original, y las placas fueron inoculadas con gotas de 3 µl usando un dispositivo de plato para los 96 pocillos e incubadas a 28 °C. El crecimiento fue registrado a los 3 y 7 días.

II.13.3. Condiciones de crecimiento y carga de fluoróforo para el ensayo de stopped-flow.

El ensayo de stopped-flow para la determinación del coeficiente de permeabilidad osmótica y la energía de activación de transporte de agua fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Graça Soveral (Departamento de Bioquímica e Biología Humana, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal)

La cepa de levadura YSH1172 fue crecida en medio líquido con glucosa o galactosa al 2% con agitación orbital, a 28 °C hasta una DO_{640nm} de 1, recuperadas las células por centrifugación (10,000 x g; 3 min; 25 °C), resuspendidas en medio YPD (6 gL⁻¹ peso húmedo) e incubadas a 28

°C durante una hora. Posteriormente se recuperaron las células por centrifugación (10,000 x g; 3 min; 4 °C), lavadas, y resuspendidas en sorbitol 1.4 M enfriado en hielo previamente (3 mLg⁻¹ peso húmedo) e incubadas en hielo durante 90 min.

La técnica de stopped-flow fue usada para monitorizar los cambios de volumen celular inducidos por un shock osmótico en células cargadas con un fluoróforo “auto-extinguible (self- quenching)” dependiente de concentración (Soveral *et al.*, 2007). Las células fueron pre-cargadas durante 10 min a 30 °C con el precursor no fluorescente 5-(y-6)- diacetato de carboxifluoreceína (CFDA), preparado a 1 mM en una solución isosmótica, la cual se une mediante esterasas no específicas generando la forma fluorescente (CF) que permanece principalmente en el citoplasma.

II.13.4. Evaluación del coeficiente de permeabilidad osmótica (P_f) y energía de activación (E_a) para el transporte de agua.

Los experimentos fueron llevados a cabo en un aparato de stopped-flow Hi-TECH Scientific PQ/SF-53. En cada condición experimental se realizaron y analizaron cuatro medidas según se describe en (Soveral *et al.*, 2007). En cada medida, 0.1 ml de suspensión celular (osmolaridad inicial $(\text{osm}_{\text{out}})_0 = 1.4 \text{ M}$) fue mezclada con una cantidad equivalente de solución de sorbitol hiperosmótica para producir un gradiente interior dirigido de soluto impermeante (gradiente osmótico 120 mOsmol) y salida de agua. La fluorescencia fue excitada usando un filtro de interferencia a 470 nm y detectada a 530 nm como filtro de corte. El transcurso del cambio de volumen fue seguido por extinción de la fluorescencia del fluoróforo atrapado (CF). Las señales de fluorescencia grabadas fueron filtradas y se ajustaron a una exponencial simple a partir de la cual se calculó la constante de velocidad (k). El coeficiente de permeabilidad osmótica agua (P_f) fue estimado a partir de la relación lineal entre P_f y k (Soveral *et al.*, 2007), $P_f = k (V_o/A)(1/V_w (\text{osm}_{\text{out}})_\infty)$, donde V_w es el volumen molar de agua, V_o/A es el volumen inicial por área de población celular, y $(\text{osm}_{\text{out}})_\infty$ es la osmolaridad media final después del choque osmótico. La energía de activación (E_a) del transporte de agua fue evaluada a partir de la gráfica de Arrhenius ($\ln P_f$ como una función de $1/T$), donde T es la temperatura en grados Kelvin.

II.14 Determinación de un qtl de firmeza. Análisis de genotipo

El análisis del genotipo para la determinación de un QTL de firmeza asociado al gen *FaRGlyase1* se realizó en el laboratorio de la Dra. Amparo Monfort (Centre for Research in Agricultural Genomics (CSIC-IRTA-UAB-UB), Barcelona).

Un QTL (*quantitative trait locus*) es un locus cuya variación alélica está asociada con la variación de un carácter cuantitativo, es decir, con aquellos caracteres cuantificables que varían de forma continua. La presencia de un QTL se deduce por cartografía genética, donde la variación total para un determinado carácter se divide en componentes asociados a una o varias regiones cromosómicas discretas. El análisis de los QTL para un carácter involucra en primer lugar escoger y cruzar dos líneas parentales que difieran en uno o más caracteres cuantitativos y, posteriormente, analizar la segregación de la descendencia para relacionar cada QTL con un marcador genético conocido, o un intervalo de marcadores. La identificación de los QTLs que afectan un determinado carácter cuantitativo en un organismo se basa en la teoría de ligamiento y recombinación. Las poblaciones más aptas para mapear QTLs son las derivadas del cruce de dos líneas puras.

En nuestro trabajo se analizó una secuencia preliminar del genoma de *F. × ananassa* para encontrar la secuencia genómica alrededor del gen, y se detectó una secuencia simple de repetición (SSR) utilizando software el Tandem Repeat Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). El diseño de cebadores que flanquean la SSR se llevó a cabo utilizando el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Dos poblaciones diferentes de fresas de cultivo y un cultivar de colección fueron genotipados con SSRFaRGLyase1 como marcador. El ADN de 93 individuos de una población F2 Dover × Camarosa, 93 individuos de una población reproductora F1 P03 × P05, y 48 líneas de un cultivar de colección incluyendo a los parentales de las poblaciones fueron extraídos y amplificado por PCR usando cebadores SSRFaRGLyase1: Fw 5'-TCT TGC ATG ACA ACC TTC AA-3' y Rv 5'-GGG AAT ATG TGG CTT TGA TTC-3'. SSRFaRGLyase1 fue mapeado en la población F2 Dover × Camarosa usando el software JoinMap (Van Ooijen, 2006). Para el análisis del QTL de la firmeza se aplicó el software QTL Qgene (Joehanes y Nelson, 2008).

II.15 Determinación del contenido de agua de los frutos. Curva de estatus hídrico.

El contenido de humedad de frutos frescos de fresa se obtuvo de una muestra de 10 frutos en los diferentes estadios de desarrollo (VI, V3, B, R, SM, SN), que fueron secados en un horno a 75 °C durante 48 horas hasta que la masa no cambió entre los intervalos de pesada. Se llevaron a cabo tres replicas por cada estadio de fruto analizado.

Para el propósito de determinar el contenido de humedad (Moisture content, MC), se realizaron tres replicas para obtener una media del valor de MC por cada muestra. La pérdida de peso en el secado hasta un peso final constante se registró como contenido de humedad basado en el método desarrollado por la AOAC (1984) y usando la siguiente ecuación: $((M_o - 220 M_s)/M_o) \times$

100; donde MC es el contenido de humedad, M_0 es la masa inicial y M_s es la masa final del fruto en gramos.

II.16 Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con los programas GraphPad InStat y SPSS Statistics 17.0. Los análisis estadísticos de caracteres cuantitativos se llevaron a cabo mediante un test “t de Student” donde los valores estadísticos de significación fueron $*P\text{-value} \leq 0.05$, $**P\text{-value} \leq 0.01$ y $***P\text{-value} \leq 0.001$ o mediante un análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba de contraste (post-hoc de Scheffe) donde el valor estadístico de significación fue $p < 0.05$.

III. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1984. Official method of analysis. 14th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Asif M.H., Dhawan P., Nath P. (2000). A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**: 109-115.
- Barceló M., El Mansouri I., Mercado J.A., Quesada M.A., Pliego-Alfaro F. (1998). Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **54**: 29-36.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)*, **57**: 289–300.
- Bernard P. and Couturier M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-Topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, **226**: 735-745.
- Bernard P., Kezdy K.E., Melderer L.V., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N. and Couturier M. (1993). The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *Journal of Molecular Biology*, **234**: 534-541.
- Bombarely A, Merchante C, Csukasi F, Cruz-Rus E, Caballero JL, Medina-Escobar N, Blanco-Portales R, Botella MÁ, Muñoz-Blanco J, Sanchez-Sevilla J, Valpuesta V. 2010. Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC Genomics*, **11**: 503.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Bustamante C.A., Civello P.M., Martínez G.A. (2009). Cloning of the promoter region of β -xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Science*, **177**: 49-56.
- Caballero J.L., Valpuesta V., Muñoz-Blanco J. (2001). *Introducción a la biotecnología vegetal. Métodos y aplicaciones*. Publicaciones de la Obra Social y Cultural de Cajasar, Córdoba.
- Christie P.J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, **179**: 3085-3094.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**: 3674-3676.
- Creelman R.A., Bell E., Mullet J.E. (1992). Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, **99**: 1258-1260.
- de Folter S1, Immink RG, Kieffer M, Parenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC. 2005. Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *The Plant Cell*, **17**: 1424-1433.
- de la Riva G.A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron. Journal Biotechnology*, **1**: 1-16.
- El Mansouri L., Mercadi J.A., Valpuesta V., Lopez-Aranda J.M., Pliego-Alfaro F.,

- Quesada M.A.** (1996). Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports*, **15**: 642–646.
- Gelvin S.B.** (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 16-37.
- George E.F.** (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd. Edington. England.
- Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pérez-Pérez J, Oliveros JC, Lorenzo O, Solano R.** 2011. Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *The Plant Journal*, **66**:700-711.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research*, **27**: 297-300.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoot R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation Vir and T-region of *Agrobacterium tumefaciens* To-plasmid. *Nature*, **303**: 179-181.
- Hoffmann T., Kalinowski G., Schwab W.** (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal*, **48**: 818-826.
- Hooyakaas P.J.J. and Beijersbergen A.** (1994).The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*.*Annual Review of Phytopathology*, **32**: 157-179.
- Horobin, R.W.** (1988). Understanding histochemistry: selection, evaluation and design of biological stains. *E. Horwood*, 172p.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N., Wallroth M., Eichholz D., Rogers S.G., Fraley R.T.** (1985).Transferring genes into plants.*Science*, **227**: 1229-1231.
- Houde M., Dallaire S., N’Dong D., Sarhan F.** (2004). Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnology Journal*, **2**: 381- 387.
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**: 1425-1436.
- Joehanes R, Nelson JC.** 2008. QGene 4.0, an extensible Java QTL analysis platform. *Bioinformatics* **24**: 2788–2789.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A.** (2002). Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193-195.
- Koncz C. and Schell J.** (1986). The promoter T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* vector. *Molecular Genetics and Genomics*, **204**: 383-396.
- Landy I.** (1989).Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.*Annual Review of Biochemistry*, **58**: 913-949.
- Lazo G.R., Pascal A.S., Ludwig R.A.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*.*Biotechnology*, **9**: 963-967.
- Liu Z.R. and Sanford J.C.** (1988).Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue.*HortScience*, **23**: 1057-1059.

- López-Aranda J.M., Pliego-Alfaro F., López-Navidad I., Barceló-Muñoz M.** (1994). Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal of Horticultural Science*, **69**: 625-637.
- Mancinelli, A.L., Schwartz, O.M.** (1984). The photoregulation of anthocyanin synthesis. *Plant Cell Physiology*, **25**: 93-105.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). Aised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Oliveros, J.C.** (2007). **VENNY online tool** (<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).
- Pedersen S.B.** (2001). Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the iCycler iQ™ detection system. *BioRadiations* (BioRad), **107**: 10-11.
- Potrykus I.** (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 205-225.
- Rabino I., Mancinelli A.L.** (1986). Light, temperature and anthocyanin production. *Plant Physiology*, **81**: 922-924.
- Raviv M., Reuveni O., Goldschmidt E.E.** (1987). The physiological basis for loss of rootability with age in avocado seedlings. *Tree Physiology*, **3**: 115-122.
- Rock C.D. and Zeevaart J.A.D.** (1990). Abscisic (ABA)-aldehyde is a precursor to and 19,49-trans-ABA-diol a catabolite of, abscisic acid (ABA) in apple. *Plant Physiology*, **93**: 915-923.
- Schaart JG, Dubos C, Romero De La Fuente I, van Houwelingen AM, de Vos RC, Jonker HH, Xu W, Routaboul JM, Lepiniec L, Bovy AG.** 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *The New Phytologist*, **197**:454-467.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton J.-M, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Rojas JJR, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troggio M, Viola R, Ashman T-L, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Girona EL, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM.** 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**: 109–116.
- Soveral G, Madeira A, Loureiro-Dias MC, Moura TF.** 2007. Water Transport in Intact Yeast Cells as Assessed by Fluorescence Self-Quenching. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2341–2343.
- Spolaore S., Trainotti L., Casadoro G.** (2001). A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 845-850.
- Shuman S.** (1991). Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 11372-9.

- Van Leeuwen, W., Hagendoorn, M., Ruttink, T., Van Poecke, R., Van der Plas, L., Van der Krol, A.** (2000). The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**: 143a-143t.
- Van Moerkercke A, Haring MA, Schuurink RC.** (2011). The transcription factor EMISSION OF BENZENOIDES II activates the MYBODORANT1 promoter at a MYB binding site specific for fragrant petunias. *The Plant Journal* **67**: 917–928.
- Van Ooijen JW.** 2006. JoinMap, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, The Netherlands: Kyazma BV.
- Verdonk JC.** (2006). Floral scent production by *Petunia hybrida*. PhD thesis. University of Amsterdam.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal*, **33**: 949-956.
- Weigel D., Glazebrook J.** (2006). In planta transformation of *Arabidopsis*. *Cold Spring Harbor Protocols* doi: 10.1101/pdb.prot4668.
- Zhang M., Yuan B., Leng P.** (2009). The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, **60**(6):1579-1588.

CHAPTER 1

The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell walls middle lamellae.

This chapter has been published as:

Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Luis Caballero J, Munoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2013. The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonatelyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of Experimental Botany*. 64: 1471-1483.

Footnote:

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaRGLyase1* (CO381780.1).

CHAPTER 1

The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell walls middle lamellae.

Abstract

Pectins are essential components of primary plant cell walls and middle lamellae, and are related to the consistency of the fruit and its textural changes during ripening. In fact, strawberries become soft as the cortical parenchyma cells' middle lamellae are extensively degraded during ripening, leading to the observed short postharvest shelf life. Using a custom-made oligo-based strawberry microarray platform, a putative rhamnogalacturonate lyase gene (*FaRGLyase1*) was identified. Bioinformatic analysis of the *FaRGLyase1* sequence allowed for the identification of a conserved rhamnogalacturonate lyase domain, which was also present in other putative *RGLyase* sequences deposited in the data-bases. Expression of this *FaRGLyase1* occurred mainly in the receptacle concurrently with ripening, and it was positively regulated by ABA and negatively by auxins. *FaRGLyase1* gene expression was transiently silenced by injecting live *Agrobacterium* cells harboring RNAi constructs into fruit receptacles. The light and electron microscopy analyses of these transiently silenced fruits revealed that this gene is involved in the degradation of pectins present in the middle lamella region between parenchymatic cells. In addition, genetic linkage association analyses in a strawberry-segregating population have shown that *FaRGLyase1* is linked to a QTL linkage group related to fruit hardness and firmness. Results show that *FaRGLyase1* could play an important role in the fruit ripening-related softening process that reduces strawberry firmness and post-harvest life.

Introduction

The octoploid cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) is a financially important fruit that has a short post-harvest shelf life owing to its rapid softening during ripening. Since fruit texture

is of commercial importance for consumer acceptability and for its harvest and transportation, there exists a great interest in controlling the textural qualities of this fruit. This has prompted research on biochemical and molecular biology of the cell wall polysaccharides synthesis and their degradation (Brummell and Harpster, 2001).

Fruit ripening is a genetically programmed and irreversible phenomenon involving a series of changes that lead to the development of a soft and edible ripe fruit. The chief textural changes resulting in fruit softening are due to enzyme-mediated alterations in the structure and composition of cell walls that lead to partial or complete solubilization, de-esterification and depolymerization of cell wall polysaccharides, accompanied by a loss of neutral sugars and galacturonic acid (Voragen et al., 1995; Brummell and Harpster, 2001; Rosli et al., 2004). The main classes of cell-wall polysaccharides that undergo modifications during ripening are pectins, cellulose and hemicelluloses (Prasanna et al., 2007). Pectins account for up to 60% of cell wall mass in many fruits and are the middle lamellae most abundant component. These polysaccharides play an important role in fruit consistency and in its textural changes during ripening. Although depolymerization of hemicelluloses during ripening has been observed in many fruits, throughout this process pectin degradation seems to be the main mechanism responsible for tissue softening in fruits such as tomato (*Solanum lycopersicum*) (Seymour et al., 1987), kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Redgwell et al., 1992), apple (*Malus domestica*) (de Vries et al., 1984) and strawberry (Rosli et al., 2004). In strawberries, the cortical parenchyma cells middle lamellae is extensively degraded throughout the ripening process (Perkins-Veazie, 1995), and they subsequently appear to be separated by a considerable intercellular space with little cell-to-cell contact area (Redgwell et al., 1997). At the molecular level, the largest changes in the cell wall occur in the pectin soluble fraction, which increases from 30 % in undeveloped strawberry fruit to 65 % in ripe fruit (Huber, 1984).

In addition to the above-mentioned increase on pectin solubilization, several studies have described hemicellulose depolymerization during strawberry ripening (Huber, 1984; Nogata et al., 1996; Rosli et al., 2004). Nevertheless, results from the analysis of several strawberry cultivars of varying firmness ('Camarosa' being the firmest, 'Pajaro' being intermediate and 'Toyonaka' being the softest) support the hypothesis that strawberry fruit softening could be chiefly related to pectin solubilization and depolymerization rather than to hemicellulose or cellulose catabolism (Rosli et al., 2004). It has been shown that the small amount of cellulose found in the fruit remains unaltered throughout strawberry fruit ripening (Koh and Melton, 2002; Rosli et al., 2004), and that the silencing of endo- β -1,4-glucanases expression involved in hemicellulose degradation, caused no changes to fruit firmness (Wooley et al., 2001; Palomer et al., 2006; Mercado et al., 2010).

Substantial evidence that pectin metabolism is involved in strawberry softening emerged upon completion of a functional analysis of the *FapIC* and *FaPGI* genes encoding pectate lyase and polygalacturonase, respectively. When the expression of these two genes was down-regulated in transgenic plants harboring antisense constructs, a substantial reduction in the softening of red ripe fruits was achieved (Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Benítez-Burraco et al., 2003; Quesada et al., 2009). This was accompanied by a preservation of middle lamella integrity and an increase in the amount of pectins covalently bound to the cell walls. Furthermore, the silencing of *FapIC* led to a lower depolymerization of the pectin fraction (Santiago-Doménech et al., 2008). These transgenic strawberry plants' post-harvest and processing features improved (García-Gago et al., 2009a, b; Sesmero et al., 2009). However, several negative pleiotropic effects, such as a reduction in the fruit fresh weight and fruit yield, reportedly due to the role played by pectate lyase in pollination were observed (Jiménez-Bermúdez et al., 2002).

Three kinds of pectins can be distinguished in plant cell walls: homogalacturonan (HGA), rhamnogalacturonan I (RG-I), and rhamnogalacturonan II (RG-II). In cell walls middle lamellae, HGA, a linear backbone of 1,4-linked galacturonic acid is predominant (Vincken et al., 2003). HGA contains clusters of four heteropolymeric side chains of a consistent length. These side chains and the residues to which they are connected are referred to as RG-II (Vincken et al., 2003). RGI is composed of a backbone of alternating rhamnose and galacturonic acid residues with 20 to 80 % of rhamnose residues substituted by neutral sugars side chains. Pectins are typically depicted as an extended RG-I chain, hairy regions, and isolated rhamnose residues interspersing the smooth HGA regions (Mercado et al., 2011). However, Vincken et al., (2003) proposed an alternative model in which HGA regions are side RG-I chains. In this model, RG-I would play an important structural role in cell walls and its enzymatic cleavage could have dramatic effects on the cohesion of the pectin network.

Rhamnogalacturonan-degrading enzymes such as RG-hydrolases and RG-lyases (RGases) were first identified in several fungi (Searle-van Leeuwen et al., 1992; Pagés et al., 2003). These enzymes digest the main RG-I chain (Schols et al., 1990). Although seven sequences in the *Arabidopsis* genome having homology to fungal RG lyases have been identified (<http://cellwall.genomics.purdue.edu>), little is known of the manner in which these enzymes modify plant cell walls (Vicente et al., 2007). Evidence that RG-I may play an important role has been obtained from potato transgenic plants harboring a fungal RG-lyase (Oomen et al., 2002). These plants had tubers with an altered morphology and cell wall contents which were easier to extract than those of wild-type plants.

Transcriptomic studies performed in our research group enabled us to identify a large group of genes the expression of which increased throughout strawberry fruit ripening. One of these genes, *FaRGlyase1*, displayed significant sequence homology with putative rhamnogalacturonan lyases from higher plants. In this study, we report the functional characterization of this gene through an analysis of the effects of RNA interference on *FaRGlyase1* silenced ripened fruits. Using both light and electron microscopies, we show that in ripened *FaRGlyase1* silenced fruit, both higher pectin content and middle lamella integrity were observed, in comparison with control fruit. In addition, genetic linkage association analyses in a strawberry-segregating population have shown that this gene is linked to a firmness quantitative trait locus (QTL). Thus, our results strongly support the proposal that *FaRGlyase1* is involved in the cell wall middle lamellae degradation, and that thus, it could play an important role in the dismantling of the receptacle cell walls that leads to fruit softening.

Results

Sequence analysis of the *FaRGlyase1* gene and protein

Previous analyses comparing transcriptomes of green immature versus red-ripened strawberry receptacles using a 35k microarray oligonucleotide-based platform enabled us to identify a gene encoding a putative novel cell-wall hydrolase, *FaRGlyase1*. This gene was strongly upregulated in ripened fruits. The cDNA sequence of the *FaRGlyase1* gene contains an open reading frame of 2089 bp, encodes a polypeptide of 676 aa and has a predicted molecular mass of 75.88 kDa. An InterPro scan revealed that this sequence had signatures resembling a RG lyase domain, a galactose-binding domain, a signal peptide, and a transmembrane region. In addition, a BlastN search showed a high degree of similarity between this *FaRGlyase* and putative RG lyases from higher plants, with identities ranging from 53.9 to 61.6% (Fig. 1).

Figure 1. Alignment of the deduced amino acid sequences of *FaRGlyase1* gene with other selected putative rhamnogalacturonate lyase-like sequences. The putative conserved domains appear indicated in the figure: the transmembrane region is indicated with a pink line, the signal peptide with an orange line, the rhamnogalacturonate lyase domain with a blue line, the starch-binding domain-like with a green line and galactose-binding domain like with a red line. GenBank accession numbers and sources for the respective sequences are: *Sorghum bicolor* (XM_002445666.1); *Oryza sativa* (AK120710.1); *Brachypodium distachyon* (XM_003572449.1); *Hordeum vulgare* (AK373223.1); *Glycine max* (XM_003526481.1); *Medicago trunculata* (XM_003603661.1); *Vitis vinifera* (XM_002285590.2); *Arabidopsis thaliana* (NM_127827.3); *Arabidopsis lyrata* (XM_002880407.1); *Populus trichocarpa* (XM_002308474.1); *FaRGlyase1* (CO381780.1) and *Solanum lycopersicum* (AK320067.1). Sequences were aligned using MegAlign (Windows 32; MegAlign 5.00; DNASTAR).

A phylogenetic tree analysis conducted with protein sequences revealed that *FaRGLyase1* had its highest homology with putative RG lyases isolated from *S. lycopersicum* and *Populus trichocarpa* (Fig. 2). Whilst we have not determined the biochemical activity of the FaRGLyase1 protein, these results, based on sequence similarity and comparisons alone, suggest that this gene could code for a protein with a rhamnogalacturonate activity potentially involved in the cell-wall degradation that takes place during the strawberry fruit ripening.

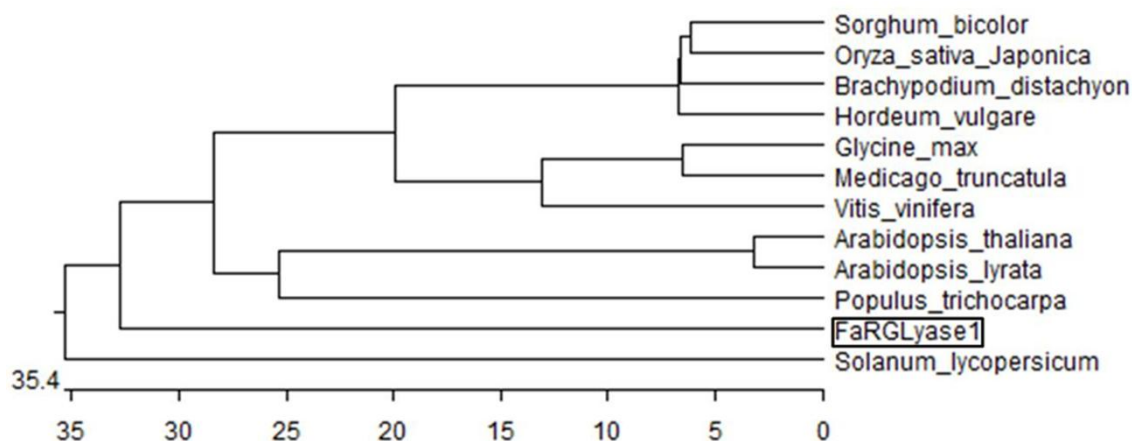


Figure 2. Phylogenetic analysis of selected putative rhamnogalacturonate lyase-like proteins. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events. GenBank accession numbers and sources for the respective sequences are: *Sorghum bicolor* (XM_002445666.1); *Oryza sativa* (AK120710.1); *Brachypodium distachyon* (XM_003572449.1); *Hordeum vulgare* (AK373223.1); *Glycine max* (XM_003526481.1); *Medicago truncatula* (XM_003603661.1); *Vitis vinifera* (XM_002285590.2); *Arabidopsis thaliana* (NM_127827.3); *Arabidopsis lyrata* (XM_002880407.1); *Populus trichocarpa* (XM_002308474.1); *FaRGLyase1* (CO381780.1) and *Solanum lycopersicum* (AK320067.1). Sequences were aligned using MegAlign (Windows 32; MegAlign 5.00; DNASTAR).

The spatio-temporal expression pattern indicates that *FaRGLyase1* is a receptacle-specific gene involved in ripening

In fruit receptacles, *FaRGLyase1* expression levels were found to be very low during the fruit elongation and developmental stages (G1 and G3), higher during the ripening stages (W and R), and maximal in the overripe and senescence stages (OR and SN) (Fig. 3A).

This same *FaRGLyase1* gene was expressed weakly in the fruit achenes in all developmental and ripening stages studied when compared against the levels obtained in the fruit receptacle at the R stage (Fig. 3B). This low expression also occurred in other vegetative tissues analysed such as leaves, roots, and runners. In all such tissues, *FaRGLyase1* expression was very low and similar to that observed in receptacles at the G1 stage (Fig. 3C).

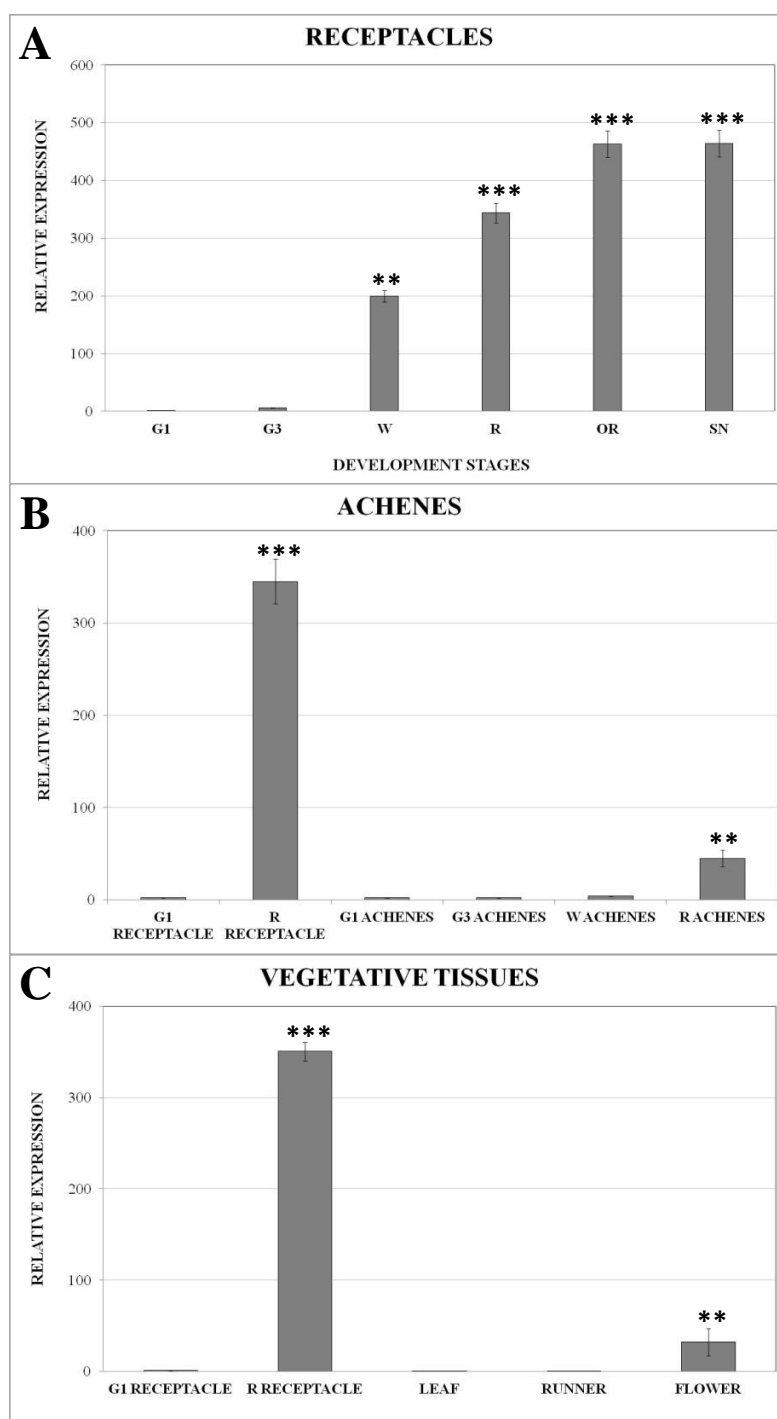


Figure 3. Analysis by qRT-PCR of the strawberry *FaRGlyase1* expression in fruit receptacle (A), achenes (B) and different vegetative tissues (C) of *F. x ananassa* cv. Camarosa (A) against immature G1-receptacle. Results were obtained using specific primers for *FaRGlyase1* gene. Quantification is based on Ct values as described in Material and Methods. The increase in mRNA value was relative to the G1 receptacle-Ct value, which had the lowest *FaRGlyase1* expression in both experiments and was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SN: senescent stage. Statistical significance with respect to reference sample (G1 fruits) was determined by the Student's *t*-test. (***) *p*-value < 0.001; (**) *p*-value < 0.01.

Hormonal regulation of the *FaRGLyase1* gene

It has been proposed that the ABA:auxin content ratio in strawberry fruit receptacles constitutes a signal that triggers the fruit ripening process (Perkins-Veazie, 1995). Thus, we decided to investigate whether *FaRGLyase1* gene expression was under the control of these two hormones. As it is known that auxins present in strawberry receptacles are synthesized by the achenes, we performed a comparative gene expression analysis between control and de-achened green fruits at the G3 stage that were externally treated with or without 2,4-D. A clear increase in the amount of *FaRGLyase1* transcripts was detected in de-achened fruits (Fig. 4). This increase did not occur, however, when these de-achened fruits were treated with a lanolin paste containing 2,4-D. These results clearly indicated that the expression of this gene was negatively regulated by auxins.

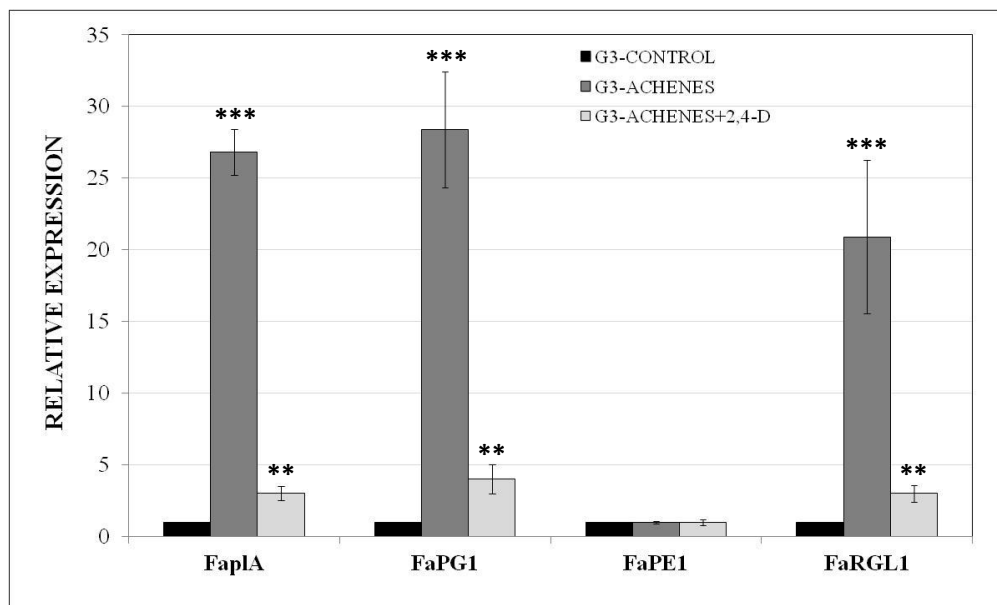


Figure 4. Analysis of the effects of removing achenes from G3 developing fruits on *FaRGLyase1*, *pectate lyase A* (*FaP1A*; U63550), *polygalacturonase 1* (*FaPG1*; AF380299) and *pectin esterase 1* (*FaPE1*; AY324809) gene expression by QRT-PCR. After auxin treatment, the increase in mRNA value was relative to G3 fruit (control), which was assigned an arbitrary value equal to unity. G3 Control: full-sized green fruit receptacle (G3 fruit); G3 - Achenes: G3 fruit receptacle without achenes for 5 days; G3 - Achenes + 2,4-D: G3 fruit receptacle without achenes plus 2,4-D for 5 days (added at day zero). Statistical significance with respect to the control sample (G3 fruits) was determined by the Student's *t*-test. (***) *p*-value < 0.001 and (**) *p*-value < 0.01.

In addition, when we depleted the receptacle ABA content by adding NDGA (Fig. 5), an important reduction in the amount of *FaRGLyase1* and other cell-wall hydrolases transcripts was observed when compared with the control fruits (Fig. 6), indicating that *FaRGLyase1* expression could be activated by ABA.

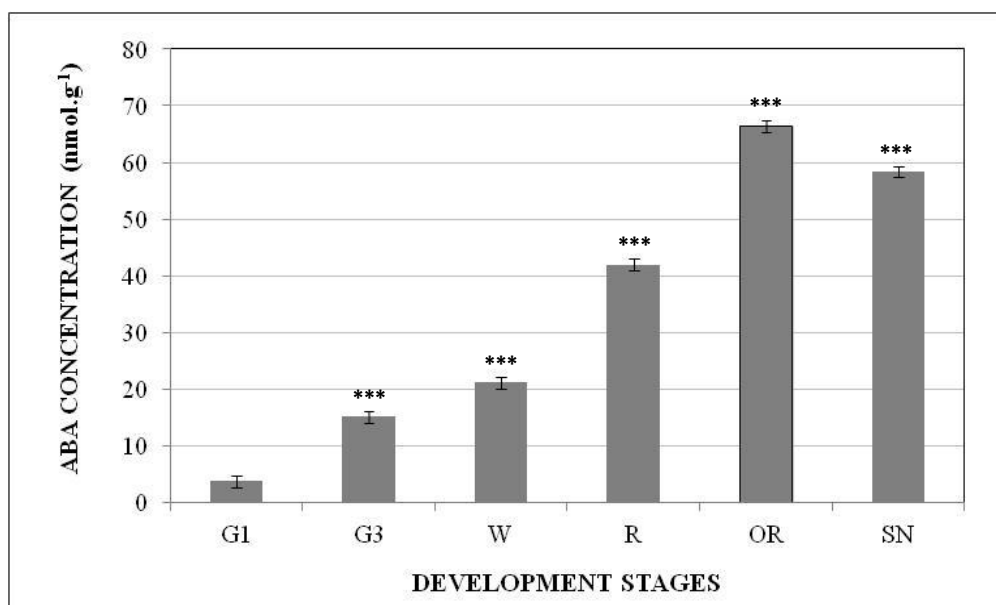


Figure 5. Quantification of ABA concentration (nmol.kg⁻¹ x 1000) in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv Camarosa) receptacles at different development stages. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SN: senescent stage. Statistical significance with respect to the reference sample (G1) was determined by the Student's *t*-test. (***) *p*-value < 0.001.

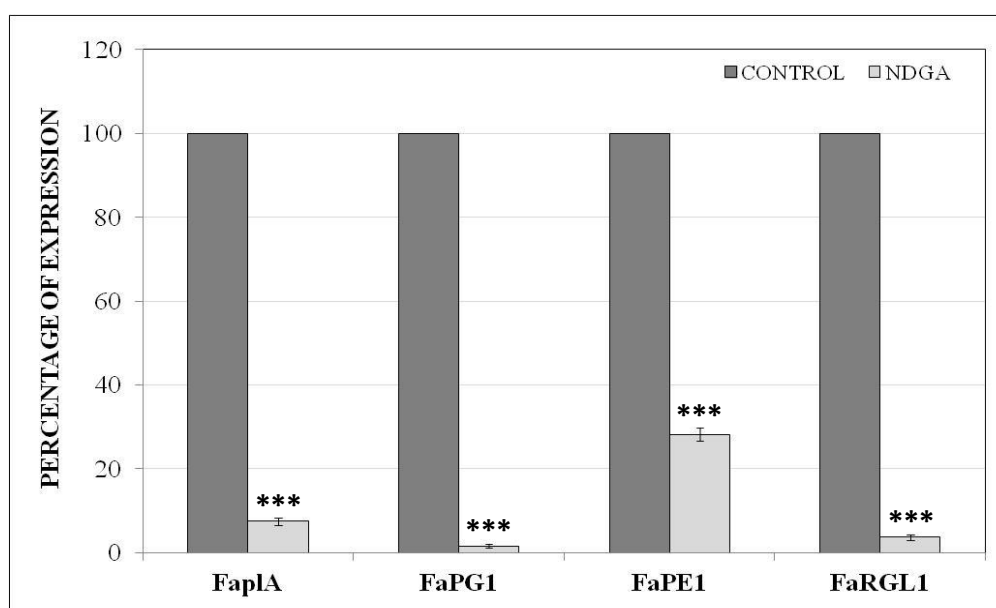


Figure 6. Analysis by qRT-PCR of *FaRGlyase1* and several cell wall hydrolases genes expression in strawberry fruits in response to NDGA. NDGA treatment performed during 8 days to G3-stage fruits. Control: G3 fruits injected with water; NDGA: G3 fruits injected with NDGA (100 μ M); *FaPLA*: pectate lyase A gene (U63550); *FaPG1*: polygalacturonase 1 gene (AF380299); *FaPE1*: pectin esterase 1 gene (AY324809). The expression levels of different genes studied in NDGA treated fruits are expressed as a percentage against their expression levels in control untreated fruits. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test. (***) *p*-value < 0.001.

Histological changes produced by the transient silencing of *FaRGLyase1* expression through agroinfiltration with RNAi constructs

Most of the fruits that were agroinfiltrated with *Agrobacterium* cells harbouring *FaRGLyase1* RNAi constructs were substantially silenced after 14 d when analysed by qRT-PCR (Fig. 7), whereas no alterations in *FaGlyase1* transcripts levels were observed in agroinfiltrated control fruits lacking RNAi. However no changes in fruit colour or size were observed in any of the agroinfiltrated fruits upon completion of the experiments (data not shown).

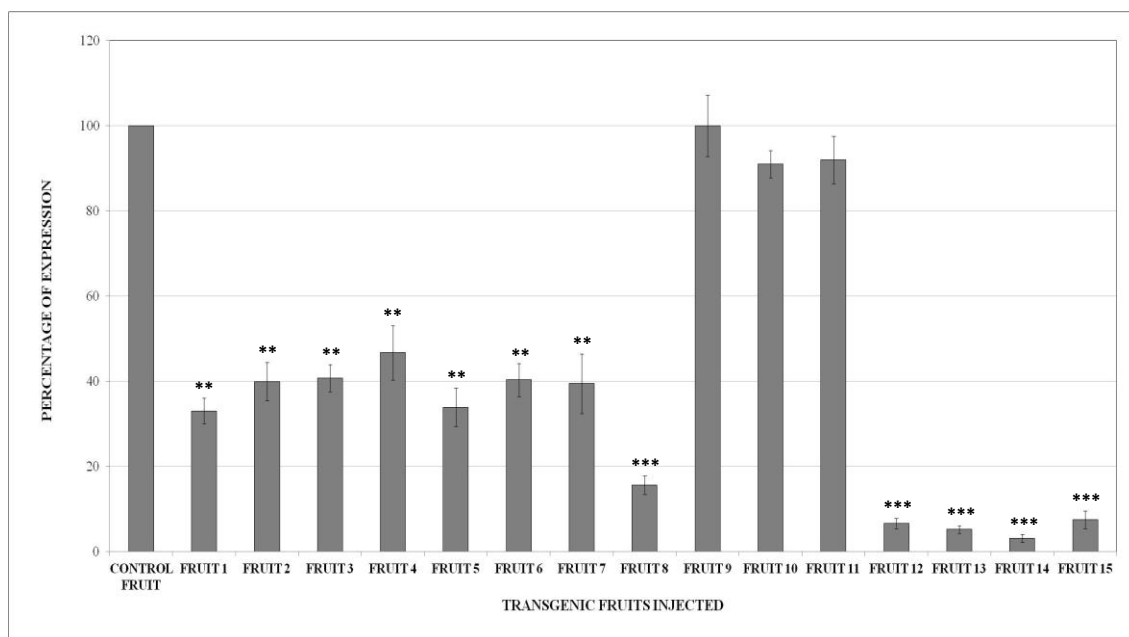


Figure 7. Analysis by QRT-PCR of *FaRGLyase1* gene expression in different transgenic strawberry fruits (*F. x ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaRGLyase1* construct. The expression level of *FaRGLyase1* in the transgenic fruits is expressed as a percentage against the control fruit (with 100 % *FaRGLyase1* expression level). Control fruit: control fruits agroinjected with pFRN empty vector; FRUIT 1-15: transgenic fruits agroinfiltrated with the pFRN-*FaRGLyase1* construct. Statistical significance with respect to control fruit was determined by the Student's *t*-test. (**) *p*-value < 0.01; (***) *p*-value < 0.001.

Hence, we performed histological comparisons involving all of the agroinfiltrated fruits. Under the light microscope, clear and visible differences were observed between fruits that had been treated with RNAi constructs upon being stained with ruthenium red, a dye that specifically stains pectins in red colour, and those that had not. Cell walls in control fruits agroinfiltrated with the construct lacking the *FaRGLyase1* RNAi construct did not retain the red staining, indicating that they lacked enough pectin to be stained and detected (Fig. 8A, B), whereas cell walls in RNAi-treated fruits were clearly stained a vivid red colour (Fig. 8C, D). Similar results were obtained when cell walls were stained with toluidine blue: controls cells walls were stained weakly (Fig. 8E, 8F), whereas those fruits treated with *FaRGLyase1* RNAi constructs

displayed a high degree of staining (Fig. 8G, H), indicating that the cell-wall integrity remained intact.

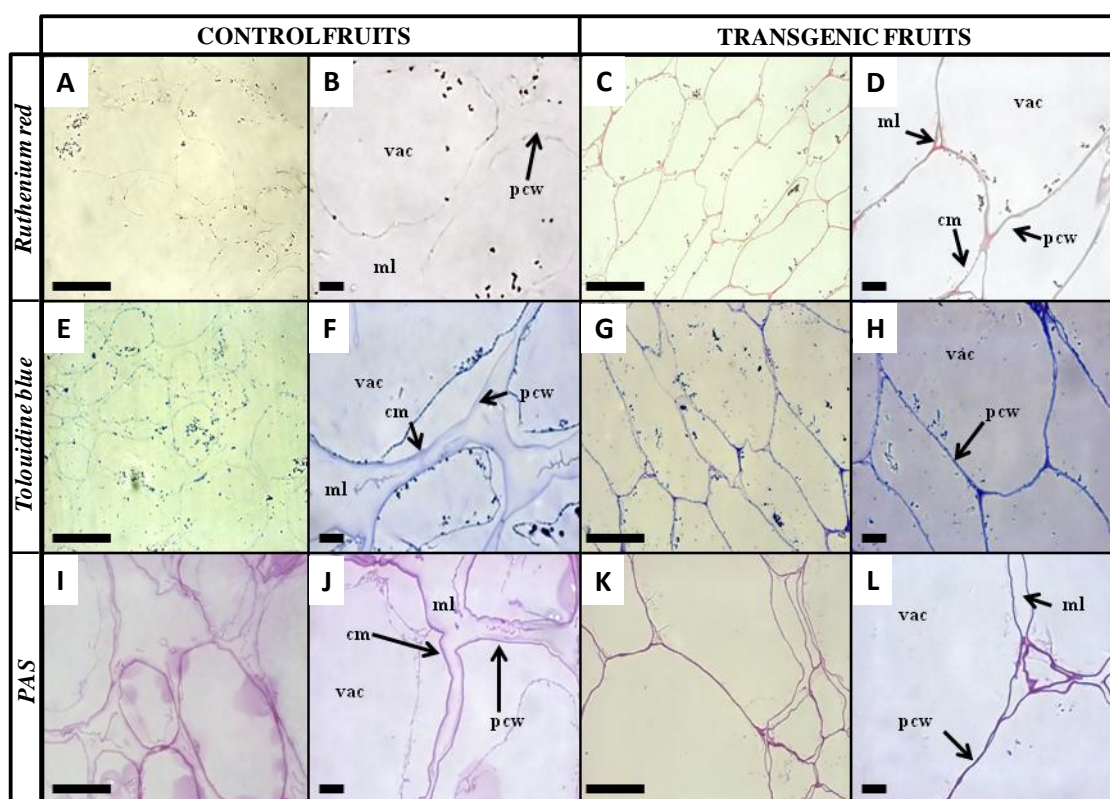


Figure 8. Histochemical characterization of cell wall degradation in control strawberry fruit receptacles and strawberry transgenic fruits agroinjected with the pFRN-*FaRGLyase1* construct. Control fruits agroinjected with the empty pFRN vector were stained with ruthenium red (A) and (B), toluidine blue (E) and (F), and PAS (I) and (J). In parallel, transgenic fruits agroinjected with the pFRN-*FaRGLyase1* construct were also stained with ruthenium red (C) and (D), toluidine blue (G) and (H), and PAS (K) and (L). (cm= cell membrane; pcw= primary cell wall; ml= middle lamella; vac= vacuolar lumen). (A), (C), (E), (G), (I) and (K) bar= 100 µm; (B), (D), (F), (H), (J) and (L) bar= 20 µm.

In addition, under the light microscope, major changes in cell structure and tissue organization were clearly noticed. Tissues obtained from control cells stained with PAS seemed to be highly disorganized, with cells appearing to be clearly separated from one another, and with few areas of direct cell-to-cell contact (Fig. 8I, J). In contrast, in the *FaRGLyase1* RNAi agroinfiltrated fruits, cells were densely packed with less intercellular space and dense cell walls (Fig. 8K, L). These results clearly indicated that, in *FaRGLyase1*-silenced fruits, parenchymatic cells had a higher degree of cell-wall integrity and organization.

These results were confirmed when the tissues were observed under an electron microscope. Parenchymatic cell walls in RNAi-agroinfiltrated ripe receptacles showed a high degree of integrity and clear, dense and well-defined middle lamellae, indicating that it was not degraded (Fig. 9C, F). However, middle lamellae in control cells that had been agroinfiltrated with

constructs lacking the RNAi were almost or completely degraded (Fig. 9A, B), with the cells being more separated from one another when compared with the RNAi-treated tissues.

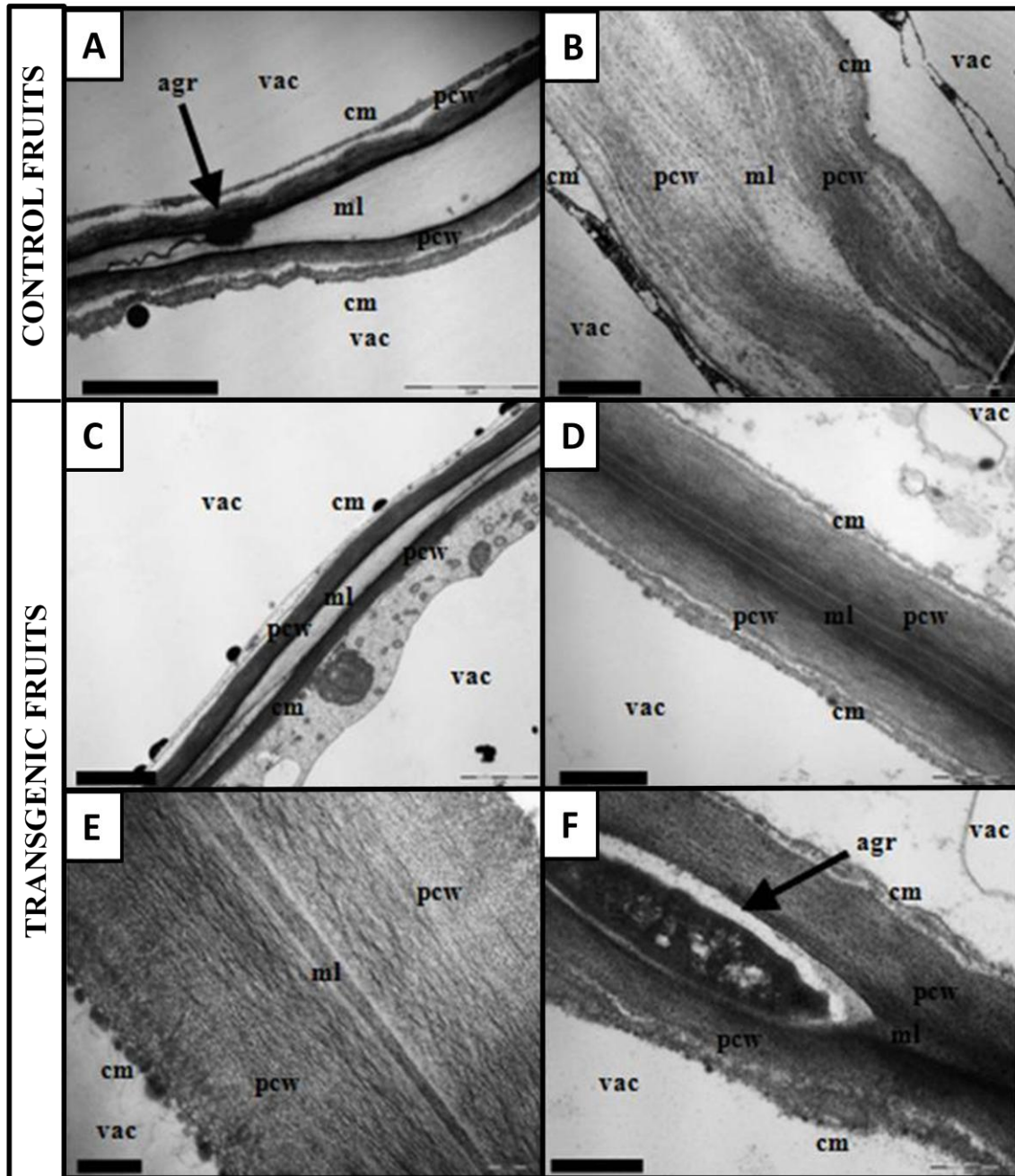


Figure 9. Ultrastructural images of cell walls in control and *FaGLyase1* silenced strawberry fruit receptacles. (A), (B): Control fruits agroinjected with the empty pFRN vector. In both pictures, the cell wall appears degraded and the middle lamella has almost completely disappeared. (C), (D), (E), (F): Transgenic fruits agroinjected with pFRN-*FaRGLyase1* construct. The middle lamella suffers a slight degradation in (C) while it retained full integrity in (D), (E) and (F). Arrows show an *Agrobacterium* bacteria cell in the middle lamella between the primary walls of neighboring cells (A) and (F). (cm= cell membrane; pcw= primary cell wall; ml= middle lamella; vac= vacuolar lumen; agr= *Agrobacterium*). (A), (B) and (C) bar= 2 μ m; (D) bar= 0.5 μ m; (E) bar= 0.2 μ m; (F) bar= 0.5 μ m.

Firmness QTL linked to the *FaRGlyase1* gene

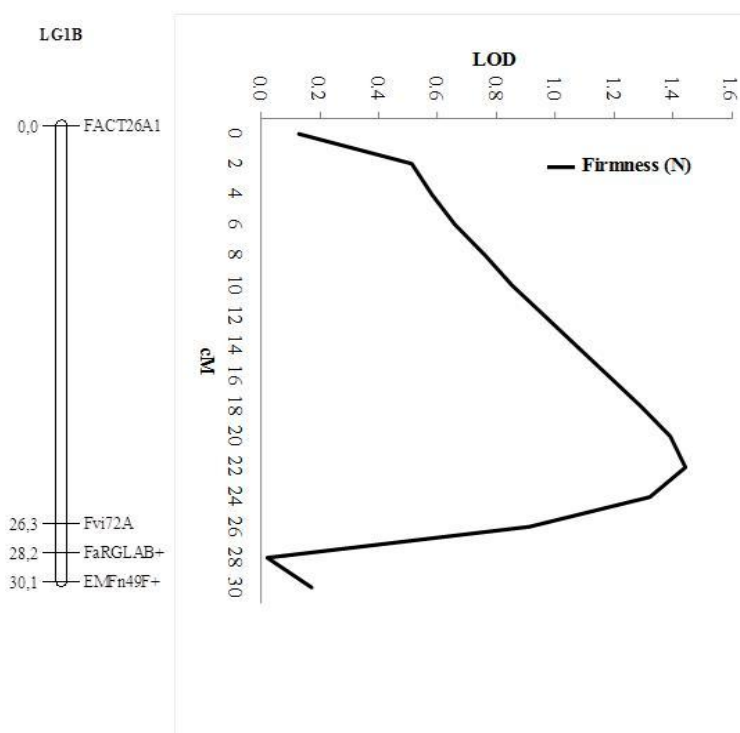


Figure 10. Linkage Group 1B of *F. x ananassa* map and QTL analysis of firmness diminution. SSRFaRGLAB+. maps at 28.2 cM of LG1B. Firmness values in F2 “Camarosa x Dover” population shows a Normal distribution. QTL was detected by Composite Interval Mapping Algorithm in QGENE software.

As we assumed that cell-wall integrity and the pectin content were linked to fruit firmness, we analysed whether the *FaRGlyase1* gene was related to the degree of firmness of the strawberry fruit by conducting a genetic linkage association analysis. This gene is located in a region of the LG1 chromosome of *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011), and aligns with a contig that contains an SSR sequence 2.5 kb downstream of the *FaRGlyase1* gene in the *F. x ananassa* genome sequence. An SSR marker was designed and amplified in parental lines of an F2 Dover × Camarosa population. The detected polymorphism was mapped and the marker was located between EmFn49 and Fvi72A of the homologous LG1-B strawberry octoploid map (unpublished data) that is syntenic with LG1 *Fragaria* diploid map. A firmness diminution QTL was detected at same position [Fig. 10; logarithm of odds (LOD) <2.0]. To verify this QTL, a second segregating population was genotyped and phenotyped. The SSR marker polymorphism analysis in a P03×P05 F1 breeding population by ANOVA revealed a statistical significance of $P=0.0162$ ($P < 0.05$; Table 1) between the presence of allele 222 and firmness diminution (Fig. 11). Notwithstanding the fact that we detected a low LOD, in other populations and a cultivar collection we verified that the ANOVA showed a linkage between genes and firmness diminution of $P=0.0162$ ($P < 0.05$).

Allele	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
0	49	83.74	0.68	82.38	85.10
1	43	81.29	0.73	79.84	82.74

Table 1. Anova statistical analysis of firmness diminution and allele 222 presence of SSRFaRGLAB+ in strawberry breeding population P03xP05. Allele presence is 1 and absence 0, Number means total individuals in each category. Mean of firmness value. Std Error uses a pooled estimate of error variance.

Firmness segregation in a cultivated strawberry collection of 48 cultivars, including commercial varieties and older lines, also showed a statistical association of the presence of the allele 222 marker with fruit firmness diminution (data not shown).

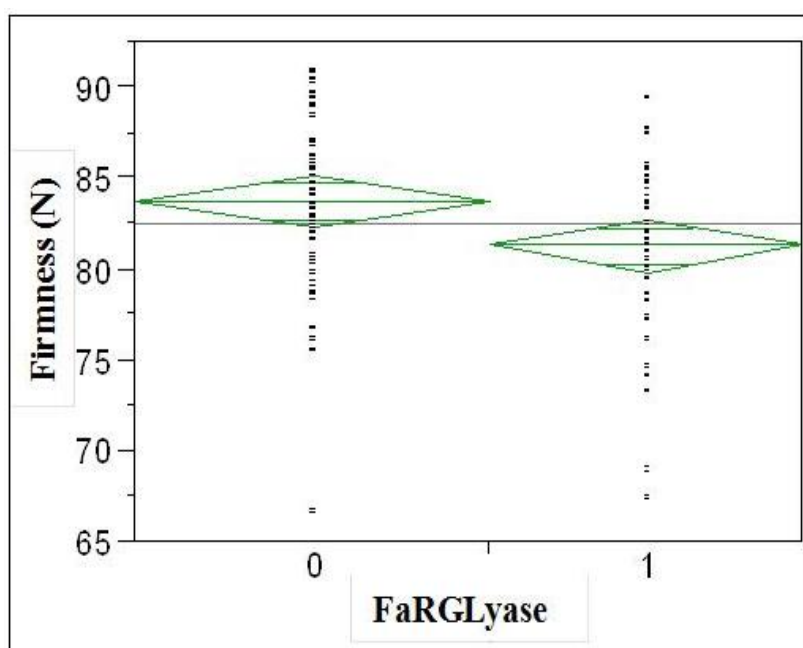


Figure 11. Graphic representation of allele association with firmness in breeding population. Oneway Anova statistical analysis of firmness data in strawberry P03 x P05 F1 breeding population was calculated in relation to allele 222 SSRFaRGLyase1 marker segregation. (1) Means presence of allele and (0) means absence. JMP8.0 software from SAS Institute Inc., statistical package was used.

Discussion

Although the role of HGA degrading enzymes has been well characterized, little attention has been devoted to the role played by RG-I and RG-I-degrading enzymes in the disassembly or degradation of cell walls and middle lamellae. RGase activity has been reported in tomato, apple, and grape by Gross *et al.* (1995). More recently, Naran *et al.* (2007) reported RG lyase activity in expanding cotton cotyledons, and seven sequences have been identified in the *Arabidopsis* genome having homology to fungal RG lyases

(<http://cellwall.genomics.purdue.edu>). In strawberry, our comparative transcriptomic analysis between immature (green) and ripe (red) receptacles from immature (green) versus ripe (red) strawberry fruits revealed several sequences encoding putatively RG lyases whose expression was strongly upregulated in ripe fruits, suggesting the possibility that these genes may play a pivotal role in strawberry cell-walls degradation and fruit softening.

Bioinformatic analyses showed that the deduced protein of the *FaRGlyase1* gene contained well-documented functional domains, such as a conserved RG lyase domain and a galactose-binding domain. This sequence also had a putative conserved signal peptide similar to that of two previously characterized cell-wall pectin-degrading enzymes, pectate lyase and polygalacturonase, indicating that this protein is actually excreted out of the cells (Fig. 1) (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2009). All of these data provided us with evidence that the protein coded by the *FaRGlyase1* gene may have RG lyase activity, that it is excreted out of the cells, and that it might be located in the fruit receptacle cell wall. However, enzymatic activity assays should be performed in order to definitively assign an RG lyase role to this protein.

***FaRGlyase1* gene is highly expressed when softening of ripe fruit receptacles occurs**

The *FaRGlyase1* gene displayed an expression pattern clearly related to ripening. This gene was expressed predominantly in the fruit receptacle, and it was weakly or not expressed in achenes or in any of the vegetative tissues analysed (Fig 3). Its expression pattern coincided with that of other strawberry pectin-degrading cell-wall enzymes such as pectate lyases and polygalacturonases (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2009). Whilst traditional studies have assumed that pectin degradation plays a minor role in strawberry softening, recent studies in which pectate lyase (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002) and polygalacturonase (Quesada *et al.*, 2009) were silenced have demonstrated that solubilization of the pectin fraction covalently linked to the cell wall was accompanied by a significant decrease in fruit firmness. The *FaRGlyase1* gene is expressed at the same time as these other pectin-degrading cell-wall hydrolases, thus supporting the suggestion that the enzymatic degradation of ripened fruit cortical cell walls might influence fruit softening. However, most pectinases are also involved in the pollination process, contributing to the emergence of the pollen tube and/or the growth of the pollen tube down the style (Hadfield and Bennett, 1998; Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). In fact, the suppression of pectate lyase expression in strawberry reduced fruit weight and yield is likely to be due to poor pollination (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Whether or not *FaRGlyase1* is involved in the pollination process should be evaluated using stable transgenic plants.

***FaRGLyase1* gene expression is regulated positively by ABA and negatively by auxins**

Auxins produced by the achenes are released into the strawberry receptacle and are responsible for the main changes occurring in early fruit development. Once fruits reach the white stage, a decline in auxin production occurs, and this seems to trigger the ripening process (Perkins-Veazie, 1995). In line with this, several studies have shown that the expression of many strawberry fruit ripening-related genes encoding cell-wall hydrolases such as pectate lyases and polygalacturonases are induced prematurely upon removal of the achenes (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Redondo-Nevaldo *et al.*, 2001; Benítez-Burraco *et al.*, 2003). *FaRGLyase1* was also induced prematurely in receptacles when achenes were removed in the early stages of fruit development. However, this induction did not take place when auxin 2,4-D was applied to these de-achened fruits, indicating that this gene is also regulated by auxins (Fig. 4).

It has been suggested that ABA plays a major role in the ripening of both climacteric and non-climacteric fruits (Rodrigo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). In fact, it seems that the ABA:auxin ratio is the signal that could actually trigger strawberry fruit ripening (Perkins-Veazie, 1995). Recently, a number of studies have provided molecular evidence that ABA promotes the strawberry ripening-related production of anthocyanins (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011). ABA levels gradually increase concurrently with the ripening process in strawberry fruit (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011) (Fig. 5). However, additional comprehensive molecular studies regarding the physiological and molecular role played by ABA in the regulation of strawberry ripening-related genes have not yet been published.

Experiments conducted with NDGA, an inhibitor that blocks ABA synthesis, also clearly demonstrated that the expression of *FaRGLyase1* as well as many other genes coding cell-wall hydrolases that are involved in degradation of the cell-wall pectin expression could be co-activated by ABA (Fig. 6).

FaRGLyase1 protein is involved in the degradation of cell-wall middle lamellae in fruit receptacle

The transitory silencing of *FaRGLyase1* gene expression led to a drastic middle lamella structure and integrity maintenance in ripe fruit parenchymatic cells, which otherwise were almost fully dismantled in control cells. The cell-wall structure, the cell-to-cell contact area, and the intercellular space that separated cells remained unaltered in silenced *FaRGLyase1* RNAi ripe

fruits (Fig. 8 and 9). These results clearly showed that at least this RG lyase gene could play a critical role in dismantling fruit cell walls through middle lamellae degradation in ripe fruit.

RG-I is reportedly located mainly in the primary wall, whereas the middle lamellae are enriched in HGA (Vincken *et al.*, 2003). Posé *et al.* (2010) found that strawberry pectins extracted with a chelating agent were composed mainly of galacturonic acid, whilst pectins extracted with sodium carbonate, those located within cell walls, contained a higher amount of neutral sugars. Redgwell *et al.* (1997) also found that most galactose residues, the main component of neutral side chains in RG-I, remained in cell walls upon pectin and xyloglucan extraction. Although *FaRGlyase1* could act on RG-I of the primary cell wall, its silencing by agroinfiltration had a dramatic effect on middle lamellae dissolution and on pectin degradation. An initial hypothesis to explain this fact is that a putative breakdown of RG-I mediated by *FaRGlyase1* would be necessary to relax the cell-wall structure, enabling other pectin-degrading hydrolases, such as pectate lyases, pectin methyl esterases, and endo-polygalacturonases, to access polyuronide substrate sites. A similar hypothesis has been proposed by Brummell *et al.* (1999) to explain the lower pectin depolymerization observed in transgenic fruits with a silenced expansin expression. It is noteworthy that the pectate lyase protein was immunolocalized within cortical cells (Benítez-Burraco *et al.*, 2003). Histological studies of ripened fruits with a silenced pectate lyase gene showed a significant reduction in middle lamella dissolution when compared with control fruits (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). According to this proposal, sections of *FaRGlyase1*-silenced fruits were denser when stained with ruthenium red and display fewer intercellular spaces in comparison with control fruits (Fig. 8 A-D).

Alternatively, if RG-I is the actual pectin backbone to which HGA and other pectins are attached, as proposed by Vincken *et al.* (2003), it is clear that its cleavage would have a direct impact on the middle lamella. In agreement with this, Oomen *et al.* (2002) found that the expression of a fungal RG lyase in potato tubers modified the localization of galactan side chains within the wall. In transgenic tubers, most galactan side chains were located in the middle lamella at cell corners in contrast to the normal location in the primary wall of the wild type. These authors suggested that the function of the RG-I backbone may be to secure side chains to specific locations in the wall. The lower dissolution of strawberry middle lamella when *FaRGlyase1* was silenced suggests that the RG-I backbone could have a role in anchoring HGA in the middle lamella. Finally, we cannot discard the possibility that others pectins different to RG-I could be the substrate for the *FaRGlyase1* enzyme.

The QTL analysis showed that the *FaRGlyase1* gene is linked to a group of genes implied in fruit firmness (Fig. 10 and 11). This experimental approach is functionally very relevant, and

the results strongly indicate that the *FaRGLyase1* gene plays an important key role in the fruit ripening-related softening process that reduces the firmness and post-harvest life of the fruit.

Experiments are currently in progress to obtain transgenic stable plants with a *FaRGLyase1*-silenced gene.

References

- Asif MH, Dhawan P, Nath P. 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 109–115.
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Caballero JL, Muñoz-Blanco J. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria×ananassa* c.v. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* **5**, 633–645.
- Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**, 311–340.
- Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* **11**, 2203–2216.
- Chai Y, Jia HF, Li CI, Dong QH, Shen YY. 2011. *FaPYR1* is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5079–5089.
- Cruz-Rus E, Amaya I, Sánchez-Sevilla JF, Botella MA, Valpuesta V. 2011. Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4191–201.
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, et al. 2012. The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4275–4290.
- de Vries JA, Voragen AGJ, Rombouts FM, Pilnik W. 1984. Changes in the structure of apple pectic substances during ripening and storage. *Carbohydrate Polymers* **4**, 3–13.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13–15.
- Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz F, de los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL. 2009. Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria×ananassa*) *FaWRKY1* and *Arabidopsis AtWRKY75* proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3043–3065.
- García-Gago JA, López-Aranda JM, Muñoz-Blanco J, Toro FJ, Quesada MA, Pliego-Alfaro F, Mercado JA. 2009a. Postharvest behaviour of transgenic strawberry with polygalacturonase or pectate lyase genes silenced. *Acta Horticulturae* **842**, 573–576.
- García-Gago JA, Posé S, Muñoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA. 2009b. The polygalacturonase *FaPG1* gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 766–768.
- Gross KC, Starrett DA, Chen H. 1995. Rhamnogalacturonase, -galactosidase, and - galactosidase: potential roles in fruit softening. *Acta Horticulturae* **398**, 121–130. Hadfield KA, Bennett AB. 1998. Polygalacturonase: many genes in search of a function. *Plant Physiology* **117**, 337–343.
- Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W. 2006. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria×ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal* **48**, 818–826.
- Huber DJ. 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**, 1310–1315.

- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY.** 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* **157**, 188–199.
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevaldo J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA.** 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology* **128**, 751–759.
- Joehanes R, Nelson JC.** 2008. QGene 4.0, an extensible Java QTL analysis platform. *Bioinformatics* **24**, 2788–2789.
- Koh TH, Melton LD.** 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* **26**, 23–33.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA.** 1991. A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**, 963–967.
- Marín-Rodríguez M, Orchard J, Seymour GB.** 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2115–2119.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, 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**, 867–877.
- Mercado JA, Trainotti L, Jiménez-Bermúdez L, Santiago-Doménech N, Posé S, Donolli R, Barceló M, Casadoro G, Pliego-Alfaro F, Quesada MA.** 2010. Evaluation of the role of the endo- -(1,4)-glucanase gene FaEG3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* **55**, 8–14.
- Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Quesada MA.** 2011. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement. In: Jenks MA, Bebeli PJ, eds. *Breeding for fruit quality*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 81–104.
- Muñoz C, Hoffmann T, Escobar NM, Ludemann F, Botella MA, Valpuesta V, Schwab W.** 2010. The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3**, 113–124.
- Muñoz C, Sanchez-Sevilla JF, Botella MA, 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**, 12598–12604.
- Naran R, Pierce ML, Mort AJ.** 2007. Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons. *The Plant Journal* **50**, 95–107.
- Nogata Y, Yoza K, Kusumoto K, Ohta H.** (1996) Changes in molecular weight and carbohydrate composition of cell wall polyuronide and hemicellulose during ripening in strawberry fruit. In: Visser J, Voragen AGJ, eds. *Pectins and pectinases*. Amsterdam: Elsevier Science, 591–596.
- Oomen RJFJ, Doeswijk-Voragen CHL, Bush MS et al.** 2002. Immunofragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development. *The Plant Journal* **30**, 403–413.
- Pagès S, Valette O, Abdou L, Bélaïch A, Bélaïch JP.** 2003. A rhamnogalacturonan lyase in the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *Journal of Bacteriology* **185**, 4727–4733.

- Palomer X, Llop-Tous I, Vendrell M, Krens FA, Schaart JG, Boone MJ, van der Valk E, Salentijn EMJ.** 2006. Antisense down-regulation of strawberry endo- α -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* **171**, 640–646.
- Pedersen SB.** 2001. Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the iCycler iQ™ detection system. *BioRadiations (BioRad)* **107**, 10–11.
- Perkins-Veazie P.** 1995. Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews* **17**, 267–297.
- Posé S, Kirby AR, Mercado JA, Morris VJ, Quesada MA.** 2010. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers* **88**, 882–890.
- Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN.** 2007. Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**, 1–19.
- Quesada MA, Blanco-Portales R, Posé S, García-Gago JA, Jiménez-Bermúdez S, Muñoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Muñoz-Blanco J.** 2009. Antisense downregulation of the *FaPGI* gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology* **150**, 1022–1032.
- Raab T, López-Ráez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Muñoz-Blanco J.** 2006. FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell* **18**, 1023–1037.
- Redgwell RJ, Melton LD, Brasch DJ.** 1992. Cell-wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiology* **98**, 71–81.
- Redgwell RJ, Fischer M, Kendall E, MacRae EA, Perry J, Harker R.** 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* **203**, 174–181.
- Redondo-Nevado J, Moyano E, Medina-Escobar N, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.** 2001. A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* **52**, 1941–1946.
- Rodrigo MJ, Alquezar B, Zacarías L.** 2006. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany* **57**, 633–643.
- Rosli HG, Civello PM, Martínez GA.** 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria × ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 823–831.
- Santiago-Doménech N, Jiménez-Bermúdez S, Matas AJ, Rose JKC, Muñoz-Blanco J, Mercado JA, Quesada MA.** 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2769–2779.
- Schols HA, Geraeds CCJM, Searle-van Leeuwen MJF, Kormelink FJM, Voragen AGJ.** 1990. Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydrate Research* **206**, 105–115.
- Searle-van Leeuwen MJF, Broek LAM, Schols HA, Beldman G, Voragen AGJ.** 1992. Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the

deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**, 347–349.

Sesmero R, Mitchell JR, Mercado JA, Quesada MA. 2009. Rheological characterisation of juices obtained from transgenic pectate lyase-silenced strawberry fruits. *Food Chemistry* **116**, 426–432.

Seymour GB, Laslett Y, Tucker GA. 1987. Differential effects of pectolytic enzymes on tomato polyuronides *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry* **26**, 3137–3139.

Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN et al. 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**, 109–118.

Spolaore S, Trainotti L, Casadoro G. 2001. A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany* **52**, 845–850.

Van Ooijen JW. 2006. *JoinMap, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Wageningen, The Netherlands: Kyazma BV.

Vicente AR, Saladie M, Rose JKC, Labavitch JM. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 1435–1448.

Vincken JP, Schols HA, Oomen R, McCann MC, Ulvskov P, Voragen A, Visser R. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132**, 1781–1789.

Voragen AGJ, Pilnik W, Thibault JF, Axelos MAV, Renart CM. 1995. Pectins. In: Stephen AM, ed. *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker, 287–369.

Wooley LC, James DJ, Manning K. 2001. Purification and properties of an endo- α -1,4-glucanase from strawberry and downregulation of the corresponding gene, *cell*. *Planta* **214**, 11–21.

Zhang M, Leng P, Zhang G, Li X. 2009. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1241–1252.

CHAPTER 2

Functional characterization of *FaNIP1;1* gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit.

This chapter has been published as:

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Gelis S, Ramos J, Sabir F, Soveral G, Prista C, Iglesias-Fernández R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2015. Functional characterization of *FaNIP1;1* gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Science*. 238: 198-211

Footnote:

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaNIP1;1* (KJ159565).

CHAPTER 2**Functional characterization of *FaNIP1;1* gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit.****Abstract**

Strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) is a soft fruit with high water content at ripe stage (more than 90 % of its fresh weight). Aquaporins play an important role in plant water homeostasis, through the facilitation of water transport and solutes. We report the role played by *FaNIP1;1* in the receptacle ripening process. The analysis by qRT-PCR of *FaNIP1;1* showed that this gene is mainly expressed in fruit receptacle and has a ripening-related expression pattern that was accompanied by an increase in both the abscisic acid and water content of the receptacle throughout fruit ripening. Moreover, *FaNIP1;1* was induced in situations of water deficit. Additionally, we show that *FaNIP1;1* expression was positively regulated by abscisic acid and negatively regulated by auxins. The water transport capacity of *FaNIP1;1* was determined by a stopped-flow spectroscopy in yeast over-expressing *FaNIP1;1*. Glycerol, H₂O₂ and boron transport were also demonstrated in yeast. On the other hand, GFP-*FaNIP1;1* fusion protein was located in plasma membrane. In conclusion, *FaNIP1;1* seems to play an important role increasing the plasma membrane permeability, that allows the water accumulation in the strawberry fruit receptacle throughout the ripening process.

Introduction

Strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) is a non-climacteric soft fruit in which water represents more than 90 % of its fresh weight at ripe stage. During ripening process, the strawberry fruit undergoes a series of physiological and biochemical changes that are determined by gene expression modifications and influenced by the endogenous biosynthesis of abscisic acid (ABA) and which influence its organoleptic properties (flavour, texture, color and aroma) and determine its final quality (Jia et al. 2011; Molina-Hidalgo et al. 2013; Medina-Puche et al. 2014). In this sense, the ABA biosynthesis increases drastically in the last stages of fruit

ripening in strawberry fruit receptacle (Jia et al. 2011; Symons et al. 2012; Medina-Puche et al. 2014).

In the strawberry fruit, water movements are crucial since they allow for the rapid expansion of fruit (Coombe, 1976). Previous studies reported that berry size correlates positively with the amount of irrigation water applied during flowering and fruit development (Blatt et al. 1984). Water balances are always accompanied by water movements across biological membranes by means of diffusion or through water channels (Ruiz-Lozano et al. 2009). Thus, the presence of water channels, known as aquaporins, in plasma membranes is necessary when high rates and low resistance of water transport across membranes are required (Kaldenhoff et al. 2008).

Aquaporins belong to the family of integral membrane channel proteins known as Major Intrinsic Proteins (MIPs). MIPs are particularly abundant in plants and exhibit high multiplicity and diversity, which is likely due to the necessity of a fine-tuned water control that allows the plant to adapt to changing environmental conditions (Hove and Bhave, 2011). According to intracellular locations and sequence similarities, they are divided into seven subfamilies: the plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), NOD26-like intrinsic proteins (NIPs), small and basic intrinsic proteins (SIPs), the GlpF-like intrinsic protein (GIPs), hybrid intrinsic protein (HIP) and the uncategorized X intrinsic protein (XIP) (Hove and Bhave, 2011). Plant MIPs not only transport water, but they also facilitate the transport of small neutral solutes such as glycerol (Biela et al. 1999) and boron (Dordas et al. 2000; Takano et al, 2006; Mitani et al. 2008; Fitzpatrick and Reid, 2009; Schnurbusch et al. 2010).

The relationship between water movement and fruit ripening has been widely studied (Chen et al. 2001; Hu et al. 2003; Picaud et al. 2003; Fouquet et al. 2008). In apples, two putative *PIP* genes were related to fruit development and osmotic stress (Hu et al. 2003). Similarly, in grape and strawberry, two *PIP1* aquaporins were associated with the ripening process (Picaud et al. 2003; Fouquet et al. 2008; Mut et al. 2008; Alleva et al. 2010). In addition, several *SINIP* genes were detected in different development stages in tomato fruits (Reuscher et al. 2013).

Changes in aquaporins gene expression during fruit growth and the ripening process have been associated with the increase of fruit softening. In fact, softening has also been claimed to be a physical consequence of a reduction in cell turgor (Thomas et al. 2006; Saladiè et al. 2007; Wada et al. 2008, 2009). In strawberry fruits, where retaining firmness is so important, the amount of *FaPIP1* and *FaPIP2* mRNAs was higher in ripen fruits of a firmer cultivar (Camarosa) as compared to that found in a softer cultivar (Toyonaka) (Alleva et al. 2010). Additionally, the co-expression of *FaPIP1;1* and *FaPIP2;1* genes resulted in an increase of

water permeability in the strawberry fruit (Alleva et al. 2010; Yaneff et al. 2014). These data seem to indicate that both *FaPIP* genes might be responsible for the control of cell water homeostasis and the accumulation that coincides with strawberry fruit ripening that can be related to maintaining fruit turgor (Mut et al. 2008; Alleva et al. 2010). Thus, the transcription of *PIP* aquaporins can be fine-tuned with the environment in response to declining water availability (Surbanovski et al. 2013).

In plants, ABA biosynthesis is strongly stimulated by water deficit (Endo et al. 2008). It has been proposed that ABA increase in drought stress is due to the perception of a putative hydraulic signal by yet unknown sensor(s) that would lead to conversion of the physical signal into the hormonal ABA signal, which would determine the adaptive responses related with changes in cell turgor (Christmann et al. 2013). Both ABA biosynthesis and the generation of this hydraulic signal are strongly induced in drought stress.

Additionally, banana transgenic plants over-expressing *MusaPIP1;2* presented an increase of tolerance to different abiotic stresses including drought (Sreedharan et al. 2013). A similar behavior was observed in *Arabidopsis thaliana* plants over-expressing the heterologous *MaPIP1;1* gene, which enhanced the tolerance to osmotic and drought stresses and lead to the down-regulation of *RD29a*, *RD29b*, *RAB18* and *KIN2* ABA-responsive genes during dehydration and salt stresses indicating that the *MaPIP1;1* over-expression improved the physiological status of plants under drought and salt stress conditions (Xu et al. 2014).

In this work, we report the isolation and functional characterization of the receptacle-specific *FaNIP1;1* gene during the strawberry fruit growth and ripening (cv. Camarosa). The expression of this gene is strongly induced in receptacle ripening process in fruit, where an increase in ABA biosynthesis is produced, as well as during drought stress. Besides, *FaNIP1;1* presents water transport properties and was located in plasma membrane. Our results strongly support the possibility that the *FaNIP1;1* protein could play an important role in the control of the strawberry fruit hydration that could influence fruit size and firmness in normal water conditions, as well as in keeping the fruit healthy in situations of water deficit.

Results

Structural features of the amino acid deduced sequence of *FaNIP1;1* gene

By using a *Fragaria vesca* 35 k microarray oligo-based platform, transcriptomic analyses comparing transcriptomes of immature strawberryfruits in green stage *versus* red-ripened

receptacles allowed us to identify a gene (*FaNIP1;1*) that is strongly up-regulated in ripened fruits and putatively encodes an aquaporin type NIP1;1. The cDNA sequence of *FaNIP1;1* gene contains an open reading frame of 819 bp that encodes a polypeptide of 272 amino acids with a predicted molecular mass of 30.84 kDa. The analysis of FaNIP1;1 amino acid deduced sequence using InterPro scan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) showed that the sequence contains the repeated MIP family signature NPA (Agre et al. 2002) as well as six transmembrane regions. Thus, FaNIP1;1 exhibits the canonical hourglass-shaped fold of aquaporins resulting from six α -helices (H1–H6) organized into two symmetrically arrayed tandem repeats, each containing three α -helices (H1–H3 and H4–H6) connected by more or less extended loops, in order to delineate a core water channel (Supplemental Fig. S1). Loops connecting H1–H2, H2–H3, H3–H4, H4–H5 and H5–H6 correspond to LA, LB, LC, LD and LE, respectively, are highlighted (Supplemental Fig. S1). Two highly conserved signature motifs Asn⁹⁹-Pro¹⁰⁰-Ala¹⁰¹ (NPA) and Asn²¹¹-Pro²¹²-Ala²¹³ (NPA) occur in loops LB and LE, which contain short α -helices that fold back into the core of the aquaporin to form one of the two major constriction filters occurring along the central water channel. The second constriction referred as the aromatic/arginine region (ar/R), consist of four residues, located at helix 2 (H2), helix 5 (H5) and at the LE loop, immediately before (LE1) and after (LE2) the second NPA region (Hove and Bhav. 2011). The comprehensive analysis of ar/R filter of FaNIP1;1 sequence revealed the presence of conserved amino acid residues Trp⁷⁹ (H2), Val¹⁹⁹ (H5), Ala²⁰⁸ (LE1) and Arg²¹⁴ (LE2) (Supplemental Fig. S1), which are reported crucial for transport of water and glycerol in other plant NIPs (Liu et al. 2009).

Additionally, three putative phosphorylation sites are predicted at Thr¹³⁴, Ser²¹⁵ and Thr²⁵² using the NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk>). Thr¹³⁴ and Ser²¹⁵ residues belong to the transmembrane region H3 and to the short α -helical segment of loop LE embedded into the lipid bilayer respectively, therefore it is unlikely that they are phosphorylated. On the contrary, the exposed Thr²⁵², at the cytosolic C-terminus, could actually be phosphorylated to participate in the regulation of water transport through the water channel. Besides, a Ser²⁶⁴ residue corresponding to Ser²⁶² in GmNOD26 of soybean, that has been reported as a crucial phosphorylation site (Guenther et al. 2003), was also found conserved in FaNIP1;1 (Supplemental Fig. S1).

Besides, the amino acid sequence exhibited homology with the MIP subgroup of nodulin-26-like intrinsic proteins (NIPs). The phylogenetic comparison between Nod26-like aquaporin sequences of several plants confirms that FaNIP1;1 belongs to NIP I subgroup (Fig. 1). According to the MEME analysis (Supplemental Fig. S2), motif 5 is conserved only in this subgroup. This was also supported for the phylogenetic comparison that includes all the

Fragaria vesca MIPs proteins (Supplemental Fig. S3). In addition, a BLASTP search showed a high similarity between FaNIP1;1 and other NIPs aquaporins from higher plants, with identities ranging from 55 % to 99 %. However, FaNIP1;1 showed its highest homology with OsNIP1;1, AtNIP1;1, AtNIP1;2 and AtNIP2;1 (Fig. 1 and Supplemental Fig. S2). In addition, FaNIP1;1, AtNIP1;1 and AtNIP1;2 have similar molecular weight, similar isoelectric point and the same prediction for its subcellular localization than FaNIP1;1 (Table S1).

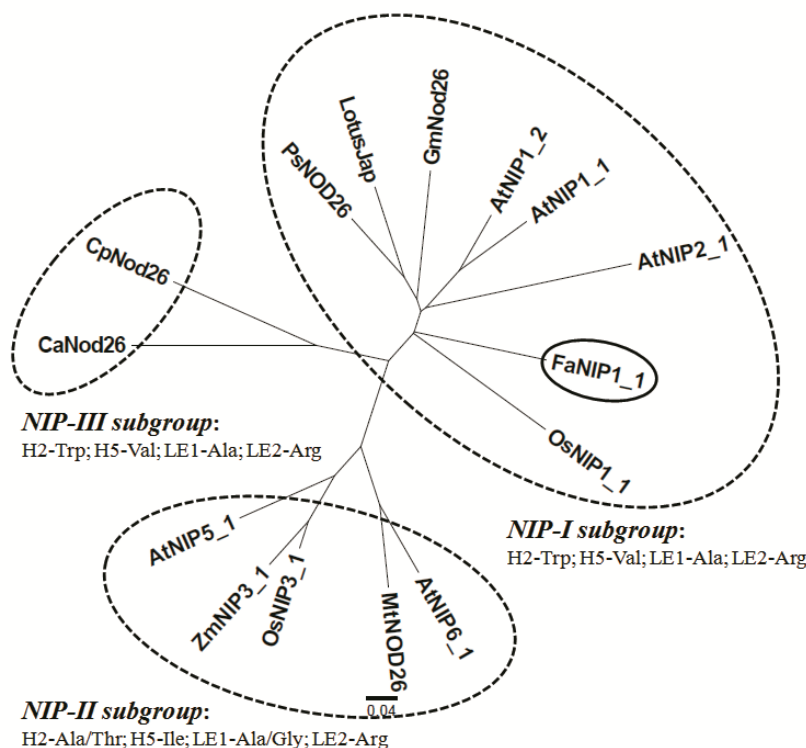


Fig. 1: Phylogenetic tree based on NIP proteins of plants including their signature sequences. OsNIP1;1: *Oryza sativa* (BAD27715); PsNOD26: *Pisum sativum* (CAB45652); LotusJap: *Lotus japonicus* (AAF82791); GmNod26: *Glycine max* (P08995); AtNIP1;2: *Arabidopsis thaliana* (CAA16748); AtNIP1;1: *Arabidopsis thaliana* (CAA16760); AtNIP2;1: *Arabidopsis thaliana* (AAC26712); CaNod26: *Cicer arietinum* (CAG34223); CpNod26: *Cucurbita pepo* (CAD67694); AtNIP6;1: *Arabidopsis thaliana* (AAF14664); AtNIP5;1: *Arabidopsis thaliana* (CAB39791); MtNOD26: *Medicago truncatula* (AAT35231); OsNIP3;1: *Oryza sativa* (AAG13499); ZmNIP3;1: *Zea mays* (AAK26753) and FaNIP1;1: *Fragaria × ananassa* (KJ159565).

Spatio-temporal expression profile of *FaNIP1;1* gene

The amount of *FaNIP1;1* transcript in fruit receptacles was very low during the fruit developmental stages (G1 and G3), but a drastic increase during the ripening (W and R) and overripe (OR) stages of ripening was observed. This expression profile was almost parallel to the increase in water and ABA content of fruit receptacle during development and ripening (Fig. 2A and Supplemental Fig. S4) which points to the existence of a positive relationship between the *FaNIP1;1* gene expression and fruit receptacle water accumulation. On the other hand,

FaNIP1;1 was weakly expressed in different vegetative tissues as well as in achenes from all developmental and ripening stages studied (Fig 2B and C). These results indicate that *FaNIP1;1* gene expression can be considered as almost fruit receptacle-specific and suggest that this protein plays an important physiological role related to water accumulation in fruit receptacle that accompanies the ripening process.

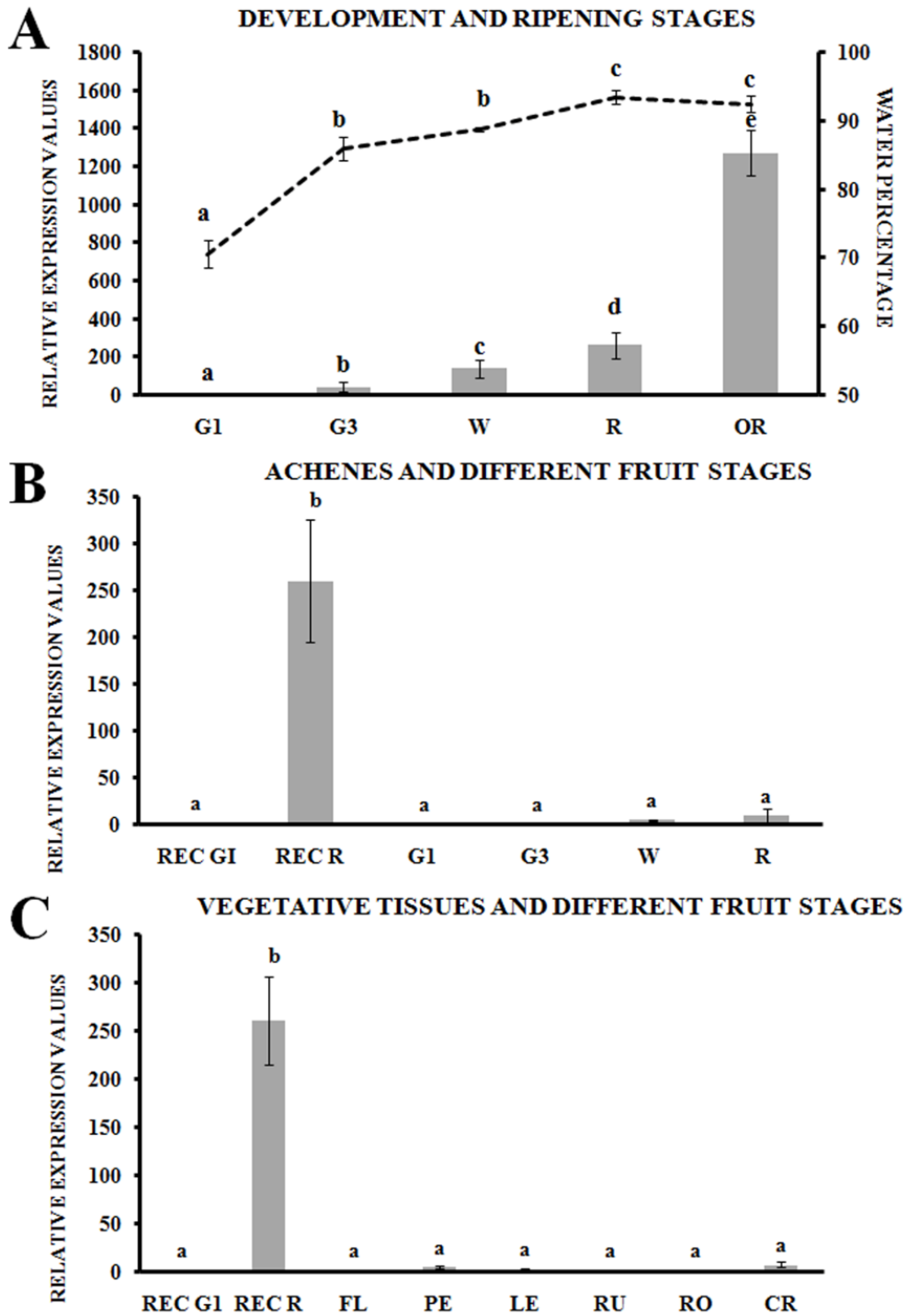


Fig. 2: Developmental expression of the strawberry *FaNIP1;1* in fruit receptacle (A), achenes vs green1 and red receptacles (B) and vegetative tissues vs green1 and red receptacles (C) of *F. x ananassa* cv. Camarosa variety and water content curve in percentage (A-line) of strawberry fruits in their different development and ripening stages. QRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaNIP1-1* gene. Quantification is based on Ct values, as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; REC G1: receptacle G1; REC R: receptacle R; FL: flowers; PE: petals; LE: leaves; RU: runners; RO: roots; CR: crowns. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

FaNIP1;1 gene expression is hormonally regulated by auxins and ABA

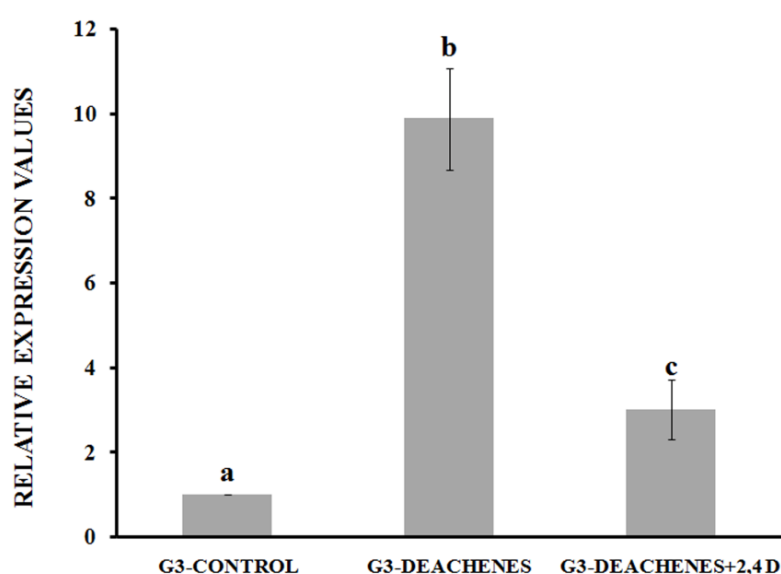


Fig. 3: Analysis of the effects of removing achenes from G3 developing fruits and their treatment with auxins on *FaNIP1;1* gene expression by qRT-PCR. After auxin treatment, the increase in mRNA value was relative to G3 fruit (control), which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G3-Control: middle-sized green fruit receptacle; G3-Deachenes: G3 fruit receptacle without achenes for 5 days; G3-Deachenes+2,4D: G3 fruit receptacle without achenes plus 2,4-D for 5 days (added at day zero). Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

It has been proposed that a defined ABA/auxin content ratio in receptacles could be a signal that provokes the strawberry fruit ripening process (Perkins-Veazie, 1995). Auxins are mainly produced by the achenes and released afterwards to the receptacles, fostering receptacle growth and development while preventing premature ripening. We performed to analyze the *in vivo* effects of auxins a comparative gene expression analysis between control and deachened green fruits at the Green 3-stage that were externally treated with or without the auxin 2,4-D. A strong increase in *FaNIP1;1* transcript amount was detected in deachened G3-fruits (Fig. 3). However, this increase in gene expression was prevented when the deachened fruits were applied with a

lanolin paste containing 2,4-D. These results clearly indicated that the expression of this gene is negatively regulated by auxins.

On the other hand, recent reports have suggested that the internal ABA concentration in fruit-receptacle may be involved in anthocyanin production during the ripening of strawberry fruits (Chai et al. 2011; Jia et al. 2011; Medina-Puche et al. 2014). To assess the role performed by ABA in the regulation of the *FaNIP1;1* expression, we decreased the ABA content in the fruit receptacle through two experimental approaches: 1) by transiently silencing the expression of the *FaNCED1* gene coding 9 cis-epoxy-carotenoid dioxygenase, the key enzyme responsible for ABA biosynthesis. This was accomplished through *in vivo* agroinfiltration with live *Agrobacterium* cells harbouring *FaNCED1*-RNAi constructs; and 2) by adding nordihydroguaiaretic acid (NDGA), a well-known inhibitor of this 9 cis-epoxy-carotenoid dioxygenase activity that is required for ABA biosynthesis (Fig. 4). Thus, in fruit receptacles depleted of ABA the amount of both *FaNIP1;1* and *FaNCED1* transcripts were strongly reduced (Fig. 4A and B). In both experimental cases analyzed, *FaNIP1;1* transcripts expression always correlated with the ABA content, like *FaNCED1* control gene (Fig. 4). These results suggest that ABA presence in the receptacle positively regulates the expression of *FaNIP1;1*.

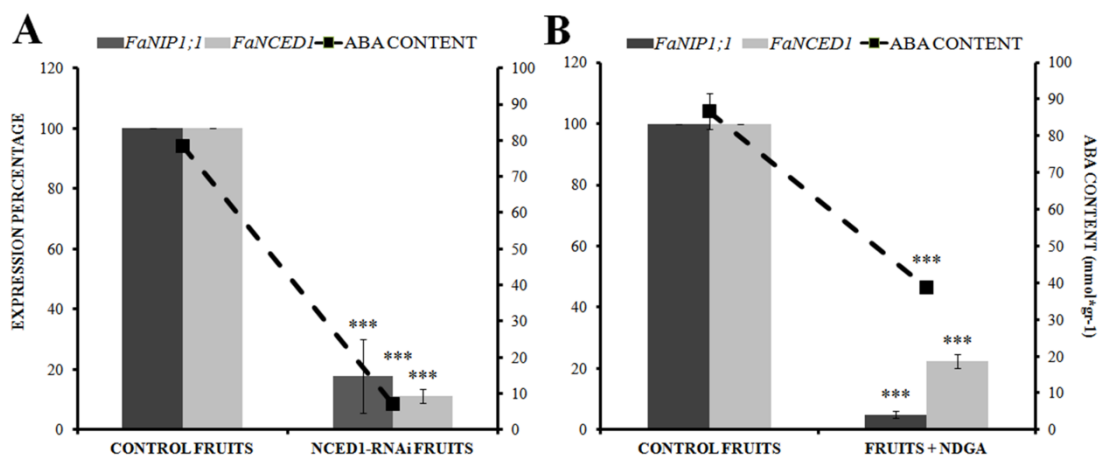


Fig. 4: Analysis by qRT-PCR of *FaNIP1;1* and *FaNCED1* gene expression in (A) strawberry G-W fruits agroinfiltrated with the *NCED1*-RNAi construct and (B) G-W fruits treated with NDGA. In both experimental situations, the dashed line indicates the ABA content in the analyzed fruits. (A) Control fruit: strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; NCED1-RNAi fruits: transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with the *FaNCED1*-pFRN construct. (B) Control fruit: G-W fruit injected with H₂O; Fruit + NDGA: G-W fruits injected with NDGA (100 μM); both samples were harvested 8 days after the beginning of treatment. The cultivar used in both experiments was *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta. Mean values ± SD of five independent experiments are shown. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (***) *p*-value < 0.001.

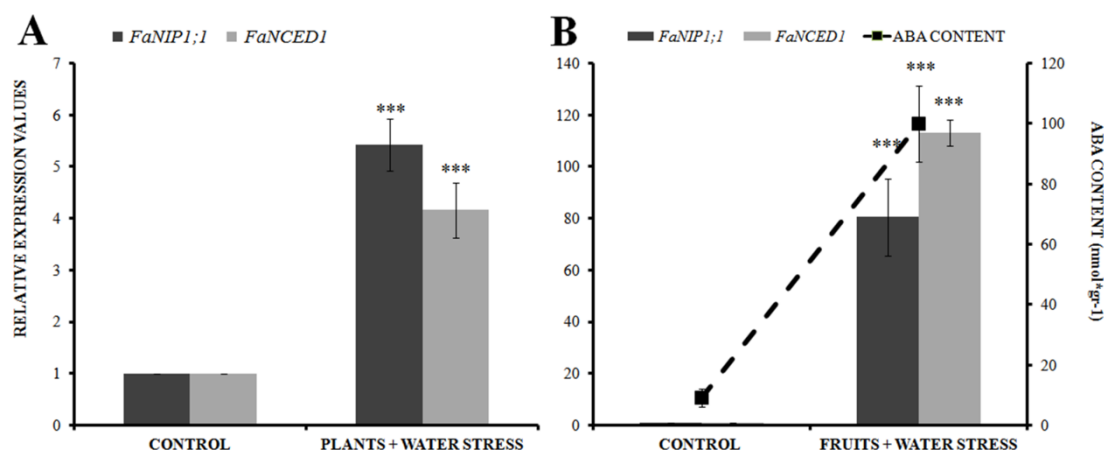


Fig. 5: Analysis by qRT-PCR of *FaNIP1;1* and *FaNCED1* gene expression in (A) whole strawberry plants and (B) strawberry G-W fruits under water stress. The dashed line indicates the ABA content in strawberry fruits under water stress. (A) Control plants were grown under normal irrigation, while the plants where the *FaNIP1;1* and *FaNCED1* gene expression was analyzed were grown without irrigation (until the substrate reached a volumetric water content of 40 %). (B) Control fruit: fruits with their pedicels immersed in MS medium with sucrose. *FaNIP1;1* and *FaNCED1* gene expression were analyzed in fruits, with their pedicels kept in the air. Both samples were harvested 4 days after the beginning of treatment. The cultivar used in both experiments was *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (***) *p*-value < 0.001.

***FaNIP1;1* gene is up-regulated under conditions of water deficit and in presence of mannitol**

The *FaNIP1;1* transcription level increased in situations of water deficiency, as in the case of irrigation depletion in whole plants, and in a more extreme situation, as in detached fruit (Fig. 5). However, the level of *FaNIP1;1* transcript was bigger in detached fruit, probably due to the fact that the water stress treatment suffered by fruits is more drastic than that suffered by the whole plant. It is known that water stress by depleting fruit water content increases ABA levels in plants and the *FaNCED1* expression, a key gene in ABA pathway biosynthesis (Seki et al. 2007; Jia et al. 2012). Thus, we used ABA content as a water stress indicator and the level of *FaNCED1* gene expression as a biomarker of increase in endogenous ABA production. Substantial changes in the internal ABA concentration in fruit receptacles detached were observed. These results indicate the relationship between *FaNIP1;1* and water availability in strawberry fruits.

Similarly, significant changes in *FaNIP1;1* gene expression after exogenous application of mannitol were observed, mainly after 24 hours of treatment (Fig. 6). These results indicate that *FaNIP1;1* is strongly up-regulated in osmotic stress conditions and clearly support the data obtained under drought stress.

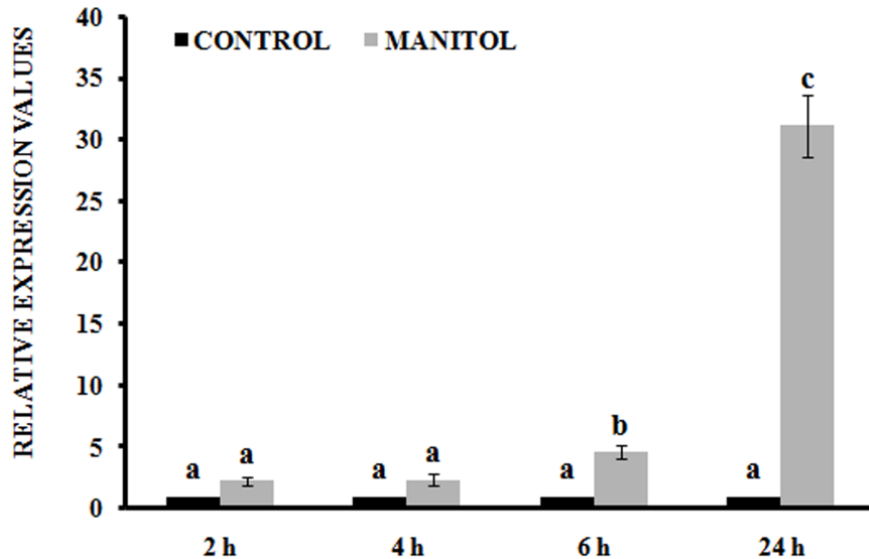


Fig. 6: Effect of mannitol treatment on *FaNIP1;1* gene expression in strawberry cell cultures. Strawberry cultured cells were treated with mannitol 200 mM. Samples were harvested at different times and the *FaNIP1;1* gene expression was measured by qRT-PCR as described in Material and methods. Control samples for each harvested time were grown without mannitol. Quantification is based on Ct values as described in Materials and Methods. The values refer to the mRNA Ct value of control samples, which were assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. The differences in gene expression found between treated and control samples were statistically analyzed by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

Subcellular localization of the FaNIP1;1 protein

The subcellular localization of the FaNIP1;1 protein was investigated by two different procedures. First of all, agroinfiltration experiments in *Nicotiana bentamiana* leaves showed us that the FaNIP1;1 protein expressed from the *35S::GFP:FaNIP1;1* construct was localized in the cell plasma membrane, while the control *35S::GFP* was present in the nucleus, cytoplasm and plasma membrane of the cells (Fig. 7A-F).

Furthermore, when the *35S::GFP:FaNIP1;1* construct was co-bombarded in onion epidermal cells the same plasma membrane localization was observed, as did the plasma membrane marker (PM) tagged to the mCherryFP (see the overlay projections of confocal stacks where co-localization is clearly observed; Fig. 7G-N). As expected, the *35S::GFP* construct was found throughout the cell (Fig. 7O-R). When the plasma membrane and vacuole tonoplast are clearly separated (Fig. 7N, arrow), the GFP:FaNIP1;1 protein localizes to the plasma membrane and not to the vacuolar tonoplast (Fig. 7M). These results are in agreement with the bioinformatic analysis, where the sub-cellular localization for FaNIP1;1 was predicted to be at the plasma membrane and no vacuolar localization signal was found in this sequence (Table S1).

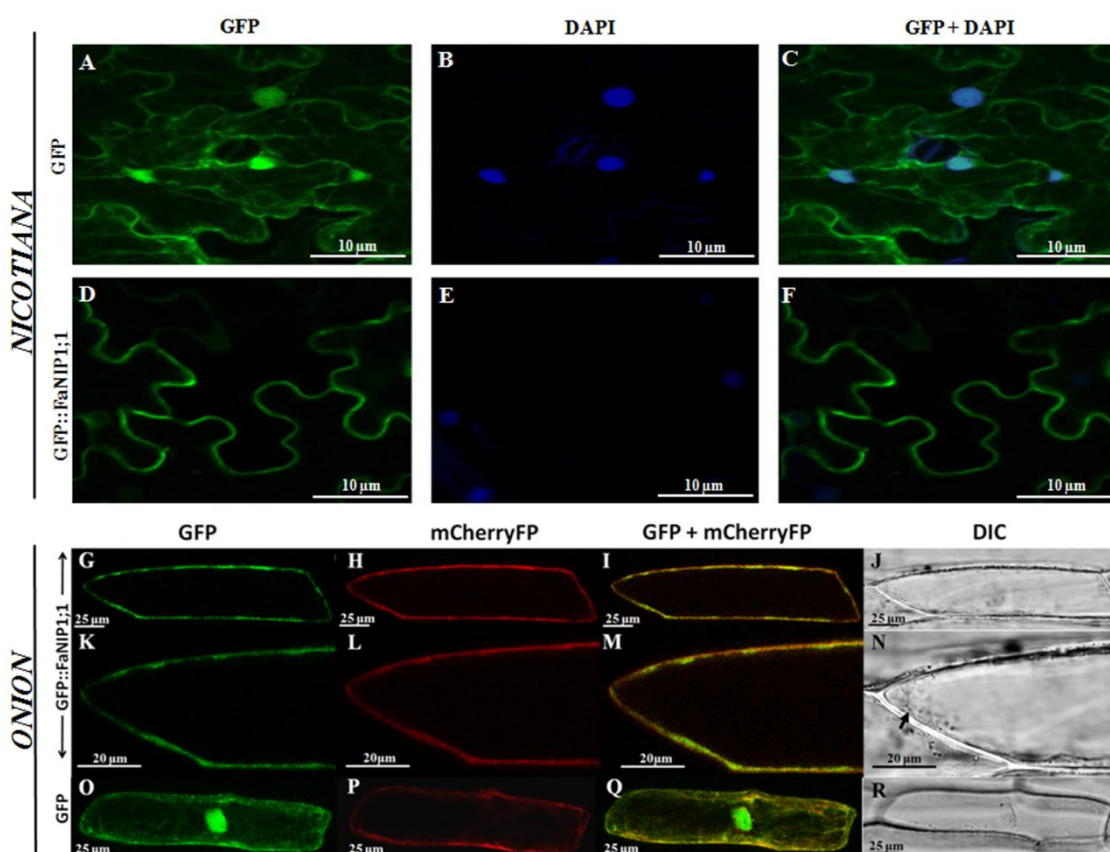


Fig. 7: Subcellular localization of the FaNIP1;1 protein in both *Nicotiana benthamiana* leaves and epidermal onion cells. The leaves of *Nicotiana benthamiana* were agroinfiltrated with translational constructs $35S::GFP::FaNIP1;1$ and with $35S::GFP$ as control. (A and D) Leaves infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid $35S::GFP$. (B and E) GFP fluorescence in *N. benthamiana* leaves infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid $35S::GFP::FaNIP1;1$. (C and F) Merged image of both agroinfiltrations. GFP: green fluorescent protein; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (nuclei dye); MERGE: merged view of the GFP and DAPI images. Onion epidermal cells were also used for subcellular localization of FaNIP1;1 protein through particle bombardment. (G-J) Overlay projections of confocal stacks spanning cells transiently co-bombarded with the translational construct $35S::GFP::FaNIP1;1$ and with the plasma membrane marker tagged to mCherryFP. (K-N) Close-up of G-J; vacuole tonoplast is indicated with an arrow in N. (O-R) Overlay projections of confocal stacks spanning epidermal cells co-bombarded with the control $35S::GFP$ construct and the plasma membrane marker tagged to mCherryFP. (G, K, O) GFP fluorescence; (H, L, P) mCherryFP fluorescence; (I, M, Q) Merged of GFP and mCherryFP fluorescences; (J, N, R) Differential Interference Contrast (DIC) images.

Water transport activity in recombinant YSH1172 strain yeast cells transformed with pYES2::FaNIP1;1

To analyze aquaporin activity, YSH1172 strain expressing *FaNIP1;1* grown in YNB with galactose were loaded with CFDA and challenged with a hypertonic sorbitol solution in a stopped-flow device. Strain containing the empty pYES2 plasmid was used as negative control.

The change in the fluorescence signal due to water efflux was used to calculate the osmotic permeability coefficient (P_f) and the activation energy (E_a) of water transport. As shown in Fig. 8, the expression of *FaNIP1;1* in YSH1172 led to a large increase in the shrinking rate compared to the same strain containing empty pYES2. When cells were grown in YNB with galactose, a rise in water permeability conferred by *FaNIP1;1* expression in pYES2 is clearly depicted ($15.84 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$), compared to the strain with empty pYES2 ($5.76 \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) (Table 1). Increase in permeability is consistent with the decrease in E_a for the strain expressing *FaNIP1;1* in pYES2 ($9.62 \pm 0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$), compared to the empty pYES2 strain ($14.76 \pm 0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Table 1), thereby ensuring that the pathway for water flow is being affected due to an increase in aquaporin activity.

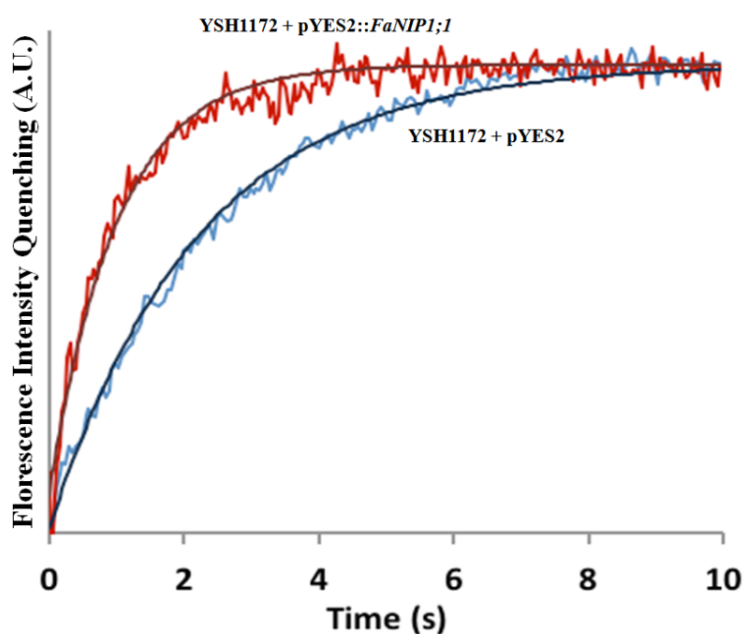


Fig. 8: Water permeability assessment of *FaNIP1;1* aquaporin expressed in *S. cerevisiae* YSH1172. Stopped-flow fluorescence signal obtained for yeast strain expressing *FaNIP1;1* in pYES2 (YSH1172+pYES2::*FaNIP1;1*) is compared with the negative control (YSH1172+pYES2). Cells were loaded with CFDA (1 mM in isosmotic solution) at pH 5 and subjected to a hyperosmotic shock with sorbitol (tonicity = 1.25). A faster cell volume change is observed for *FaNIP1;1*. The traces correspond to an average of 5 individual time courses of fluorescence intensity at 23 °C.

As expected, when we grew *S. cerevisiae* YSH1172 strain transformed with *FaNIP1;1*::pYES2 in YNB with glucose instead of galactose as carbon source, the recombinant yeast did not show functional water transport, exhibiting similar lower P_f and higher E_a to the strain harboring the empty pYES2 (Table 1). Growth on glucose had no effect on P_f and E_a for the strain transformed with the empty pYES2.

Strain	Growth media			
	YNB w/galactose		YNB w/glucose	
	P_f (cm s^{-1}) $\times 10^{-4}$	E_a (kcal mol^{-1})	P_f (cm s^{-1}) $\times 10^{-4}$	E_a (kcal mol^{-1})
YSH1172 + pYES2	5.76 \pm 0.20	14.76 \pm 0.50	3.74 \pm 0.15	14.02 \pm 0.40
YSH1172 + pYES2:: <i>FaNIP1;1</i>	15.84 \pm 0.30	9.62 \pm 0.40	3.74 \pm 0.20	14.15 \pm 0.44

Table 1. Water permeability (P_f) and activation energy (E_a) of water transport for *S. cerevisiae* YSH1172 derived strains grown in glucose and galactose. Values are mean \pm SD of three independent experiments (comprising at least 5 runs each).

Functional studies of FaNIP1;1 protein using yeast as a heterologous experimental system

Previous reports showed that the expression of a TIP2;1 aquaporin from grape (VvTIP2;1) in *S. cerevisiae* decreased resistance to osmotic stress (Leitão et al. 2012). This prompted us to analyze the effect of the FaNIP1;1 protein expression in yeast under similar physiological conditions.

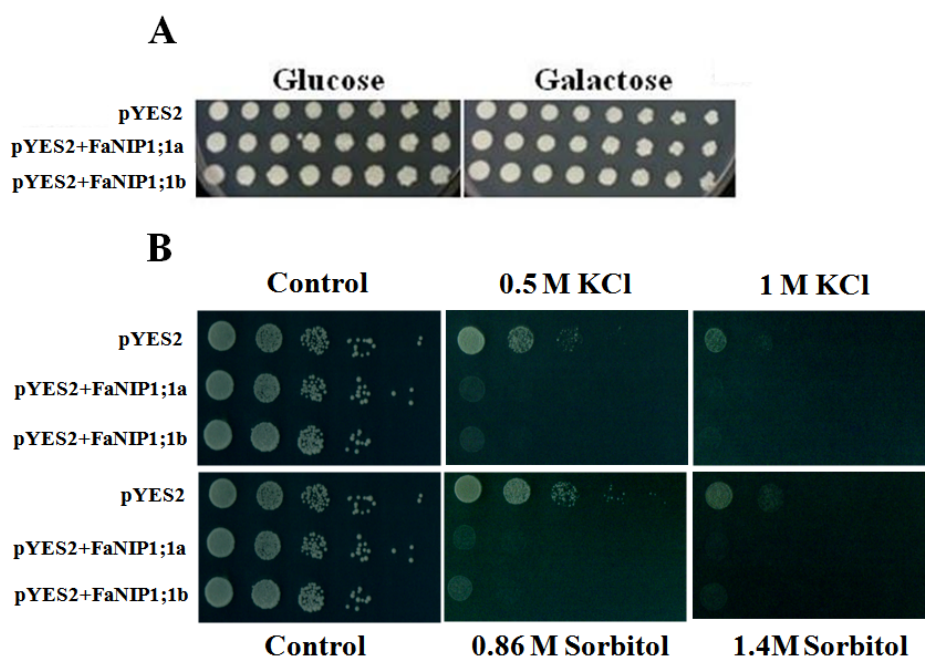


Fig. 9: Effect of *FaNIP1;1* expression on yeast growth under osmotic stress. Two independent transformants (biological replicates: FaNIP1;1a and FaNIP1;1b) of *S. cerevisiae* YSH1172 derived strain expressing *FaNIP1;1* in pYES2 plasmid were grown in YNB medium. The yeast cell cultures were serially diluted (10-fold) in sterile water and spotted onto YNB plates containing (A) galactose and glucose with increasing concentration of (B) KCl (0.5 M and 1 M) or sorbitol (0.86 M and 1.4 M). *S. cerevisiae* YSH1172 transformed with empty pYES2 plasmids were used as negative controls. Images were taken after three days incubation at 28 °C. Photographs shown are representative of three independent experiments with consistent results.

The recombinant strawberry FaNIP1;1 protein cloned into the multicopy plasmid pYES2 and expressed in two selected transformants of YSH1172 strain (biological replicates: FaNIP1;1a and FaNIP1;1b) was not toxic to yeast, since its growth was similar to the same strain transformed with the empty plasmid in YNB solid with glucose or galactose, independently (Fig. 9A). The same result was observed in YNB liquid, with the strain presenting a doubling time of around 3.5 hours and reaching to the same final biomass (results not shown).

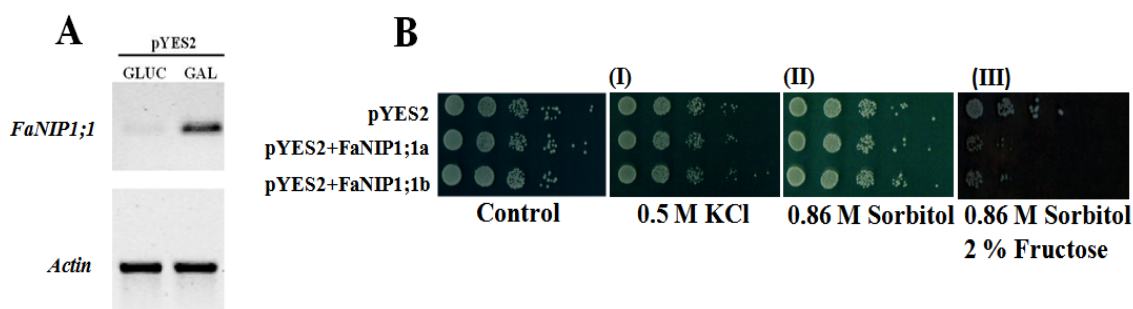


Fig. 10: (A) Analysis by qRT-PCR of *FaNIP1;1* gene expression in *S. cerevisiae* YSH1172 cells expressing FaNIP1;1 protein. (B) Determination of effect of *FaNIP1;1* expression on yeast growth under osmotic stress. Both experiments were performed with pYES2 plasmid expressing *FaNIP1;1* gene in *S. cerevisiae* YSH1172 strain in presence of different type of carbon source. (A) GLUC: glucose and GAL: galactose. In experiment (B), transformant yeast cells (biological replicates: FaNIP1;1a and FaNIP1;1b) were grown in YNB medium serially diluted (10-fold) in sterile water and spotted onto YNB plates containing containing (I) glucose + 0.5 M KCl (II) glucose + 0.86 M sorbitol (III) fructose + 0.86 M sorbitol. *S. cerevisiae* YSH1172 transformed with empty pYES2 plasmid was used as negative control. Images were taken after three days incubation at 28 °C. Photographs shown are representative of three independent experiments with consistent results.

Growth phenotypes were tested in YNB solid media containing galactose or glucose. The osmotic stress tolerance of both YSH1172 clones expressing *FaNIP1;1* was examined using KCl or sorbitol in osmotic equivalent concentration. Expression of *FaNIP1;1* increased the osmotic sensitivity of the yeast in high KCl and in high sorbitol when cells were grown with galactose as carbon source (Fig. 9B), but these differences in growth do not appear when glucose was used as carbon source (data not shown). As expected, when glucose was present, *FaNIP1;1* expression in pYES2 was not induced (Fig. 10A) and, therefore, sensitivity to osmotic stress was lost. As fructose is also present in strawberry fruits, yeast cells were grown in 0.86 M sorbitol and 2 % fructose. In that case, the YSH1172 strain expressing *FaNIP1;1* in pYES2 plasmid was even more sensitive to osmotic stress (Fig. 10B).

Transport of glycerol, H₂O₂, and boron by FaNIP1,1 aquaporin

The role of NIP proteins belonging to NIP1 subgroup in the transport of glycerol has been described (Hove and Bhave, 2011). In order to test whether the FaNIP1;1 protein could

transport glycerol and other solutes, growth tests in solid YNB medium (pH 5.5) with galactose and increasing concentrations of H_2O_2 , boric acid (for boron) and glycerol (Fig. 11 A-C) were carried out with two selected transformants (biological replicates: FaNIP1;1a and FaNIP1;1b) of YSH1172 strain transformed with the pYES2::*FaNIP1;1* vector. Yeast transformed with the empty pYES2 vector was used as a negative control. Experiments were performed in a YNB medium that contains galactose plus increasing concentrations of H_2O_2 (Fig. 11A), with yeast expressing the FaNIP1;1 protein. In this case, a clear growth inhibition was observed in yeast containing the recombinant FaNIP1;1 protein, as compared to negative control (Fig. 11A). Thus, growth of control yeast was not affected by H_2O_2 for concentrations below 0.75 mM, while the sensitivity of yeast expressing *FaNIP1;1* was clear for this H_2O_2 concentration. Above 0.75 mM H_2O_2 , general growth inhibition affecting all yeast was observed (Fig. 11A). These results depict a probable involvement of FaNIP1;1 in H_2O_2 transport that would increase the internal yeast H_2O_2 concentration, thereby causing the deleterious effect of this compound.

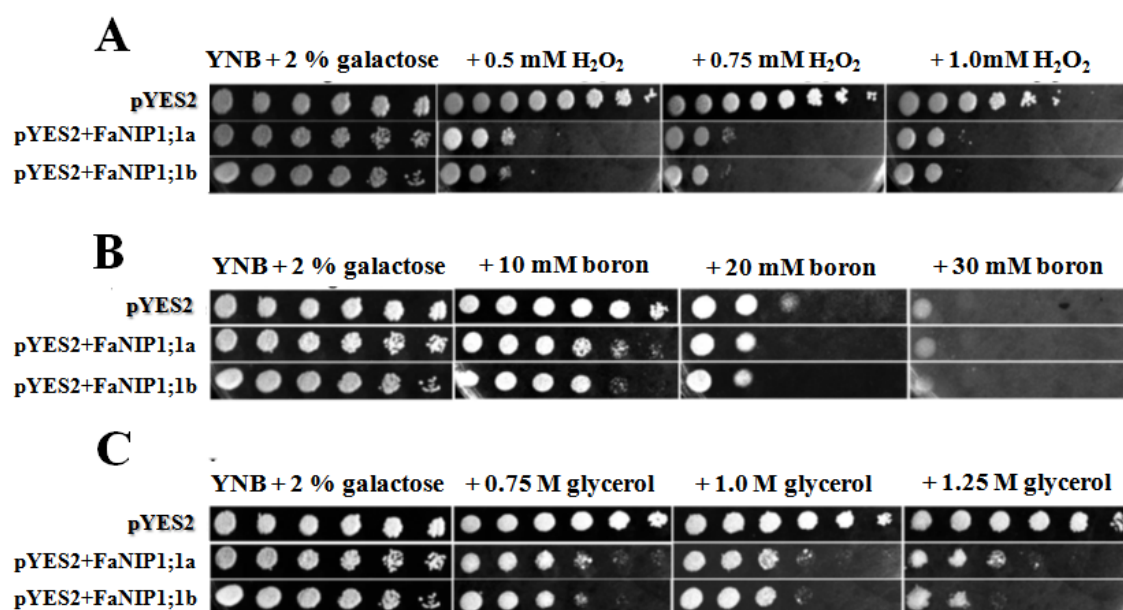


Fig. 11: Effect of *FaNIP1;1* expression on yeast growth under non-conventional substrates. Growth assays of two selected transformants of *FaFaNIP1;1* (FaNIP1;1a and FaNIP1;1b) expressing in *S. cerevisiae* strain (YSH1172 derived *aqy-null* strain transformed with pYES2 plasmid) were performed under atypical substrates. Yeast strain transformed with pYES2 plasmid was considered as control. Cells were harvested and then the original cultures were serially diluted (10-fold) in 96-well plates device on solid YNB plates supplemented with 2 % galactose alone or with (A) H_2O_2 (0.5 mM, 0.75 mM, and 1.0 mM), (B) boron as boric acid (10 mM, 20 mM and 30 mM) and (C) glycerol (0.75 mM, 1.0 mM and 1.25 mM). Growth was recorded after one week at 30 °C. Photographs shown are representative of three independent experiments with consistent results.

Similarly, the increase in the external concentrations of boric acid in the YNB growth medium caused an increased sensitivity of FaNIP1;1 expressing yeast cells to lower concentration of this

compound (10-20 mM), compared to empty plasmid strains in its growth rate (Fig. 11B). At higher concentration (30 mM), a general growth inhibition was observed in all yeast strains. In addition, we also performed growth assays in YNB with glucose for concentrations above 40 mM of boron. In this conditions, cells transformed with pYES2::*FaNIP1;1* presented stronger growth than in galactose as far as the expression of FaNIP1;1 recombinant protein was not induced in the presence of glucose. Therefore, the sensitive phenotype obtained in the presence of boron can be due to the expression of FaNIP1;1, which could be involved in the transport of boron (Fig. 11B).

Results showed that the growth rate of yeast expressing the FaNIP1;1 protein in a medium containing glycerol plus the non repressor sugar galactose was affected compared with the negative control after one week of incubation (Fig 11C). The presence of inhibitory effect on yeast growth for cells expressing the FaNIP1;1 was also observed in YNB with equivalent osmotic stress (sorbitol or KCl) (Fig 9). This suggests a putative transport of glycerol inside the yeast cell in order to compensate for the increase in extracellular osmotic pressure resulting from the higher extracellular glycerol concentrations, supporting the possibility that FaNIP1;1 aquaporin may also transport glycerol, as described for other NIP proteins (reviewed by Hove and Bhawe. 2011).

Discussion

FaNIP1;1 belongs to a NIP-I subgroup.

Bioinformatics analysis of *FaNIP1;1* deduced protein sequence shows the size, length and typical structure of MIP proteins (Baiges et al. 2002; Zardoya, 2005) and indicates that this protein belongs to the NIP (nodulin-26-like intrinsic proteins) subgroup of MIPs proteins. FaNIP1;1 has a secondary structure consisting of six transmembrane α -helices (TM 1-6) connected with five loops (A–D), loops B and E contain a small α -helix each with the highly conserved NPA motif (Sui et al. 2001; Luu and Maurel, 2005), which seems to act as size-exclusion selectivity filter (Sui et al. 2001; Wallace and Roberts, 2004; Zardoya, 2005), and the constriction region ar/R that could be involved in hydrogen-bond interruption (Sui et al. 2001; de Groot et al. 2003).

FaNIP1;1, as PsNod26 from *Pisum sativum* and LjLIMP2 from *Lotus japonica*, belongs to the NIP-I subgroup since the amino acid sequence of its ar/R filter is Trp⁷⁹ (H2), Val¹⁹⁹ (H5), Ala²⁰⁸ (LE1) and Arg²¹⁴ (LE2). Thus, substitutions within the ar/R region have been shown to be

responsible for the substrate specificity in the aquaporins (Beitz et al. 2006; Rougé and Barre, 2008).

Serine (S) residues are usually involved in the post-translational regulation of plant MIPs by phosphorylation and glycosylation; however, it has been suggested that threonine (T) residues could also participate in the MIP regulation by phosphorylation (Hove and Bhawe, 2011). We found putative phosphorylation sites at Thr²⁵² and Ser²⁶⁴ in FaNIP1;1 similarly present in SoPIP2;1 of spinach leaf and GmNodulin26 of soy-bean root (reviewed by (Hove and Bhawe, 2011)). It has been claimed that aquaporin phosphorylation could serve as a fine regulator at the cellular level to activate permeability (Johansson et al. 1996) or to activate intracellular trafficking, facilitating that the aquaporin presence in the membrane, be up- or down-regulated (Maurel, 1997; Tyerman et al. 1999). Moreover, the regulation of aquaporin phosphorylations in plants can be controlled according to developmental stages or environmental factors (Chaumont et al. 2005), as observed in bean, where the α -TIP is progressively phosphorylated during germination (Johnson and Chrispeels, 1992), or in GmNodulin26, where the phosphorylation reached a peak when nodules matured and were fully developed (Guenther et al. 2003).

***FaNIP1;1* is a ripening - and drought-related gene and is regulated by ABA.**

As with other strawberry ripening related genes (Medina-Escobar et al. 1997; Redondo-Nevado et al. 2001; Benitez-Burraco et al. 2003; Cumplido-Laso et al. 2012; Molina-Hidalgo et al. 2013), *FaNIP1;1* gene displayed an expression pattern that was clearly related to ripening, reaching its maximum expression level in ripe and overripe stages. This gene was predominantly expressed in fruit receptacle and weakly or not expressed in achenes and other vegetative tissues analyzed. Therefore, our results show that *FaNIP1;1* can be regarded as a fruit-receptacle specific aquaporin, with an expression profile matching both the increase in water content in the fruit receptacle during the last steps of ripening as well as the raising of ABA content produced during the ripening stages of fruit development (Chai et al. 2011; Jia et al. 2012; Symons et al. 2012; Medina-Puche et al. 2014). A parallel increase of *FaNCED1* expression was observed in fruit receptacle during the ripening process (Supplemental Fig. S5), which connects the *FaNCED1* expression with endogenous ABA biosynthesis in receptacle. Thus, the increase of ABA content could trigger the fruit ripening process and the expression of many ripening-related genes. This proposal is reinforced by the fact that blocking the endogenous ABA production in fruit receptacle gave rise to a decrease in the expression of several ripening-related genes, including *FaNIP1;1* (Jia et al. 2012; Molina-Hidalgo et al. 2013; Medina-Puche et al. 2014). This potential major role played by ABA in fruit ripening has been

previously suggested in both climacteric and non-climacteric fruits (Rodrigo et al. 2006; Zhang et al. 2009).

A similar regulation of other aquaporin genes expression by ABA, such as *TaNIP* from wheat (Gao et al. 2010), *HbPIP2;1* and *HbTIP1;1* from rubber trees (Tungngoen et al. 2011), *NtAQP1*, *NtPIP1;1* and *NtPIP2;1* from *Nicotiana* (Mahdieh and Mostajeran, 2009), and *ZmPIPs* from *Zea mays* (Parent et al. 2009), has been reported, supporting the idea that *FaNIP1;1* could participate in water uptake and distribution during ripening in response to the increase of the ABA content inside the strawberry receptacle cells.

On the other hand, the expression of *FaNIP1;1* gene was clearly induced in fruit receptacle under water deficit conditions as well as *FaNCED1* expression, as in the case of the ripening process. In parallel, drought stress triggered abscisic acid (ABA) production, which in turn causes stomatal closure and induces the expression of many drought stress-related genes (Seki et al. 2007 and references herein contained; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Endo et al. 2008; Ahuja et al. 2010). That indicates that the endogenous ABA level plays a key role in ABA-dependent stress responses. In plants, *NCED* genes play a crucial role in drought-stress-inducible ABA biosynthesis, its transcripts being rapidly induced by drought stress (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Seki et al. 2007 and references herein contained; Ahuja et al. 2010). *Arabidopsis thaliana* plants over-expressing *AtNCED3* gene had enhanced ABA accumulation and exhibited an increase in drought tolerance (Iuchi et al. 2001). Similarly, the orthologous *FaNCED1* gene is the regulatory enzyme that determines the rate of ABA biosynthesis in strawberry fruits (Chai et al. 2011; Jia et al. 2012; Medina-Puche et al. 2014). These results indicate that *FaNCED1* gene expression could be a biomarker of the endogenous production of ABA biosynthesis. Thus, in those drought conditions where the expression of *FaNIP1;1* was increased, a concomitant increase of *FaNCED1* gene expression was observed, clearly indicating that *FaNIP1;1* is a drought-related ABA-dependent gene. In addition, the induction of *FaNIP1;1* expression under osmotic stress conditions in presence of mannitol also support the idea that this gene is a drought-related gene.

The clear relationship between changes of *FaNIP1;1* gene expression, water and ABA content profiles in fruit receptacle along the ripening process and in fruits under situations of water deficit conditions, together with the *FaNIP1;1* capacity to transport water in yeast, is coherent with an important physiological function of this protein related to the transport of water in fruit receptacle. A similar function has been also proposed for *FaPIP1;1* and *FaPIP2;1* in ripening stages of the strawberry cultivar Selva (Mut et al. 2008; Alleva et al. 2010) and for *VvSIP1* from *Vitis* (Noronha et al. 2013). In this sense, our results suggest that *FaNIP1;1* protein together with

FaPIP1;1 and FaPIP2;1 could play a decisive role in the fine tuning of the fruit receptacle water content and hence influence the receptacle the high moisturizing of the fruit receptacle during the last steps of ripening.

Auxins regulate *FaNIP1;1* expression.

As in many other ripening related genes, the *FaNIP1;1* expression is also regulated by auxins produced by the achenes (Medina-Escobar et al. 1997; Redondo-Nevaldo et al. 2001; Benitez-Burraco et al. 2003; Cumplido-Laso et al. 2012; Molina-Hidalgo et al. 2013; Medina-Puche et al. 2014). Thus, *FaNIP1;1* expression increased when the achenes were removed from the strawberry receptacle . Regulation by auxins has been described and demonstrated for several aquaporins genes as *FaPIP1;1* gene, which has been related to the strawberry ripening process (Mut et al. 2008); *HbPIP2;1*, *HbTIP1;1* and *HbPIP1;1*, from rubber trees, related with the latex production (Tungngoen et al. 2011); and other aquaporins related to cellular water flux during leaf unfolding in tobacco or the gravitropic bending of leaf in rice (Siefritz et al. 2004; Hu et al. 2007). Thus, the dual regulation for both hormones of *FaNIP1;1* support the idea that the ABA/auxin ratio is the signal that could actually trigger strawberry fruit ripening supporting the proposal of Perkins-Veazie (1995) and the findings described by Chai et al. (2011), Jia et al. (2011) and Medina-Puche et al. (2014).

FaNIP1;1 is located in plasma membrane.

Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) are mostly located in plasma membrane to facilitate the diffusion of water and small uncharged solutes through it (Hachez et al. 2012). However, the subcellular location of members from the NIP family is still uncertain. NOD26 is expressed in the peribacteroid membrane of soybean root nodules (Weaver et al. 1994), GmNIP1;1 and GmNIP4;1 are localized in vacuoles and GmNIP2;2 in extracellular structures (Zhang et al. 2013) while the remaining most NIPs protein from *Glycine max* (Takano et al. 2006; Zhang et al. 2013), NIP5;1 from *Arabidopsis*, TaNIP and TaAQP7 from wheat (Gao et al. 2010; Zhou et al. 2012; Pandey et al. 2013) are localized to the plasma membrane. The existence of six transmembrane domains in FaNIP1;1 structure indicates that it should be anchored to a cell membrane, which is consistent with the function that we propose for it. Our results show that FaNIP1;1 is located in plasma membrane and suggest that it operates while linked to it. In strawberry, FaPIP1;1 is also localized in PM and the increment of its expression increases membrane water permeability (Mut et al. 2008). Given that both MIP proteins have a similar expression pattern during fruit ripening and similar subcellular location FaNIP1;1 may have a

similar behaviour to FaPIP1;1 and also participate in the regulation of membrane water permeability.

FaNIP1;1 transports water and some small non-ionic solute molecules.

FaNIP1;1 is a NIP-I aquaporin and it may possibly transport glycerol and other molecules such as H₂O₂ and boron besides water. Interestingly, the PIP, TIP and NIP subfamilies include at least one isoform transporting other solutes in addition to water (Mut et al. 2008). This behavior is described for plant NIPs as AtNIP1;1 and AtNIP1;2 (Mut et al. 2008) and LIMP2 from *Lotus japonicus* (Guenther and Roberts, 2000), since this MIPs subgroup is responsible for glycerol transport in plants due to the absence of GLPs in them (Zardoya, 2005). Our results endorse this proposal and FaNIP1;1 seems to carry glycerol inside the cell. In fact, the deduced protein sequence of FaNIP1:1 contains the hydrophobic residues Trp, Val and Ala of its ar/R filter that provide a non-polar surface that should hydrophobically interact with the hydrocarbon skeleton of glycerol and also the Arg residue that create a hydrogen bonding with the hydroxyls of glycerol. In addition, the tiny character of the Val and Ala residues of ar/R filter ensures its wider opening, which should facilitate the transit of glycerol and water molecules across the central water channel (Rougé and Barre, 2008). Additionally, when FaNIP1;1 was expressed in yeast, their osmotic sensitivity of cells to KCl and sorbitol increased. Their growth inhibition in the presence of boron and H₂O₂, suggests that FaNIP1;1 could also participate in the transport of these compounds *in vivo*, as it has been described for other plant MIPs (Bienert et al. 2007; Fitzpatrick and Reid, 2009; Schnurbusch et al. 2010; Bienert et al. 2014; Sabir et al. 2014). Thus, boron is an essential element in primary cell walls, where it cross-links rhamnogalacturonan II (Kobayashi et al. 1996; O'Neill et al. 2001, 2004), and its presence in there directly affects cell turgor and growth (O'Neill et al. 2001). This suggests that *FaNIP1;1* could also participate in the maintenance of strawberry fruit turgor by means of the reinforcement of the cell wall structure through boron transport. In addition, FaNIP1;1 shows the signature sequence described by Hove and Bhave (2011) related to the H₂O₂ transport. Therefore, FaNIP1;1 seems to participate in the transport of both water and small non-ionic solute molecules. A direct relationship between oxidative stress and strawberry fruit receptacle ripening has been previously proposed by Aharoni et al. (2002) since they detected the expression of 20 genes induced for both the ripening process and oxidative stress situations. Thus, the authors proposed that the oxidative stress could be part of certain strawberry ripening processes (Aharoni et al. 2002). However, the role played by FaNIP1;1, as H₂O₂ transporter and the production of a fruit receptacle oxidative stress that could be involved in the fruit ripening process remains to be established.

In conclusion, FaNIP1;1 is the unique NIP protein described in strawberry fruit so far. Its expression pattern coincides with fruit ripening and is directly related with water increase in the fruit during the ripening process. *FaNIP1;1* is induced in situations of water deficit. Hence, we propose that FaNIP1;1 may play a key role in maintaining water cellular homeostasis increasing the membrane permeability in the ripen strawberry fruit cells. Finally, *FaNIP1;1* could be a biotechnological target to improve the resistance of strawberry fruit to water deficit situations (eg: post-harvested fruits).

References

- Agre P., King L.S., Yasui M., Guggino W.B., Ottersen O.P., Fujiyoshi Y., Engel A. and Nielsen S.** (2002) Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3-16.
- Aharoni A., Keizer L.C.P., Van den Broeck H.C., Blanco-Portales R., Muñoz-Blanco J., Bois G., Smit P, De Vos R.C. and O'Connell A.P.** (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol.* 129: 1019-1031.
- Ahuja I., de Vos R.C., Bones A.M. and Hall R.D.** (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci.* 15: 664-674.
- Alleva K., Marquez M., Villareal N., Mut P., Bustamante C., Bellati J., Martínez G, Civello M. and Amodeo G.** (2010) Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (FaPIP2;1) of strawberry fruit. *J. Exp. Bot.* 61: 3935-3945.
- AOAC.** (1984) Official method of analysis. 14th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Asif M.H., Dhawan P. and Nath P.** (2000) A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 18: 109-115.
- Baiges I., Schöffner A.R., Matthias J., Affenzeller M.J. and Mas A.** (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* 115: 175-182.
- Bailey T.L., Boden M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi L., Ren J., Li W.W. and Noble W.S.** (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching *Nucleic Acids Res.* 37: 202-208.
- Barrero-Sicilia, C., Hernando-Amado, S., González-Melendi, P. and Carbonero, P.** (2011) Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley. *Planta.* 234: 391-403.
- Beitz E., Wu B., Holm L., Schultz J.E. and Zeuthen T.** (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 269-274.
- Benítez-Burraco A., Blanco-Portales R., Redondo-Nevaldo J., Bellido M.L., Caballero J.L. and Muñoz-Blanco J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria ananassa* c.v. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.* 5: 633-645.
- Biela A., Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R. and Kaldenhoff R.** (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* 18: 565-570.
- Bienert G.P., Moller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Moller I.M., Schjoerring J.K. and Jahn T.P.** (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282: 1183-1192.
- Bienert G.P. and Chaumont F.** (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1849: 1596-15604.
- Blatt C.R.** (1984) Irrigation mulch and double row planting related to fruit size and yield of “Bounty” strawberry. *HortScience* 19: 826-827.

- Chai Y.M., Jia H.F., Li C.L., Dong Q.H. and Shen Y.Y.** (2011) *FaPYR1* is involved in strawberry fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 62: 5079-5089.
- Chaumont F., Moshelion M. and Daniels M.J.** (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol. Cell.* 97: 749-764.
- Chen G.P., Wilson I.D., Kim S.H. and Grierson D.** (2001) Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar levels of fruit. *Planta.* 212: 799-807.
- Christmann A., Grill E. and Huang J.** (2013) Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 16: 293-300.
- Coombe B.G.** (1976) The development of fresh fruit. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 27: 207-228.
- Creelman R.A., Bell E. and Mullet J.E.** (1992) Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 99: 1258-1260.
- Cruz-Rus E., Amaya I., Sánchez-Sevilla J.F., Botella M.A. and Valpuesta V.** (2011) Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 62: 4191-4201.
- Cumplido-Laso G., Medina-Puche L., Moyano E., Hoffmann T., Sinz Q., Ring L., Studart-Wittkowski C., Caballero J.L., Schwab W., Muñoz-Blanco J. and Blanco-Portales R.** (2012) The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *J. Exp. Bot.* 63: 4275-4290.
- Cutler A.J. and Krochko J.E.** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4: 472-478.
- De Groot B.L., Frigato T., Helms V. and Grubmüller H.** (2003) The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J. Mol. Biol.* 333: 279-293.
- Dordas C., Chrispeels M.J. and Brown P.H.** (2000) Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124: 1349-1362.
- Encinas-Villarejo S., Maldonado A.M., Amil-Ruiz F., de los Santos B., Romero F., Pliego-Alfaro F., Muñoz-Blanco J. and Caballero J.L.** (2009) Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria × ananassa*) FaWRKY1 and *Arabidopsis* AtWRKY75 proteins in resistance. *J. Exp. Bot.* 60: 3043-3065.
- Endo A., Koshiha T., Kamiya Y. and Nambara E.** (2008) Vascular system is a node of systemic stress responses: Competence of the cell to synthesize abscisic acid and its responsiveness to external cues. *Plant Signal. Behav.* 3:1138-1140.
- Faber K.N., Haima P., Harder W., Veenhuis M. and AB G.** (1994) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. genet.* 25: 305-310.
- Fitzpatrick K.L. and Reid R.** (2009) The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley root. *Plant, Cell Environ.* 32: 1357-1365.
- Fouquet R., León C., Ollat N. and Barrieu F.** (2008) Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant Cell Rep.* 27: 1541-1550.
- Gao Z., He X., Zhao B., Zhou C., Liang Y., Ge R., Shen Y. and Huang Z.** (2010) Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, *TaNIP*, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51: 767-775.
- Gerbeau P., Güclü J., Ripoche P. and Maurel C.** (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18: 577-587.

- Guenther J.F. and Roberts D.M.** (2000) Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta*. 210: 741-748.
- Guenther J.F., Chanmanivone N., Galetovic M.P., Wallace I.S., Cobb J.A. and Roberts D.M.** (2003) Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*. 15: 981-991.
- Hachez C., Besserer A., Chevalier A.S. and Chaumont F.** (2012) Insights into plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci*. 18: 344-352.
- Hoffmann T., Kalinowski G. and Schwab W.** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J*. 48: 818–826.
- Hove R.M. and Bhawe M.** (2011) Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol. Biol.* 75: 413-430.
- Hu C.G., Hao H.J., Honda C., Kita M. and Moriguchi T.** (2003) Putative PIP1 genes isolated from apple: expression analyses during fruit development and under osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 54: 2193-2194.
- Hu L.W., Cui D.Y., Neill S. and Cai W.M.** (2007) OsEXPA4 and OsRWC3 are involved in asymmetric growth during gravitropic bending of rice leaf sheath bases. *Physiol. Plan.* 130: 560-571.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. 27: 325-333.
- Jia H.F., Chai Y.M., Li C.L., Lu D., Luo J.J., Qin L. and Shen Y.Y.** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* 157: 188-199.
- Johansson I., Larsson C., Ek B. and Kjellbom P.** (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca²⁺ and apoplastic water potential. *Plant Cell*. 8: 1181-1191.
- Johnson K.D. and Chrispeels M.J.** (1992) Tonoplast-bound protein-kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.* 100: 1787-1795.
- Kaldenhoff R., Ribas-Carbo M., Flexas J., Lovisolo C., Heckwolf M. and Uehlein N.** (2008) Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell Environ.* 31: 658-666.
- Karimi M., Inze D. and Depicker A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 7: 193–195.
- Katsuhara M., Tsuji N., Shibasaka M. and Panda S.K.** (2014) Osmotic stress decreases PIP aquaporin transcripts in barley roots but H₂O₂ is not involved in this process. *J. Plant Res.* 172: 787-792.
- Kende H. and Zeevaert J.** (1997) The five "classical" plant hormones. *Plant Cell*. 9: 1197-1210.
- Kobayashi M., Matoh T. and Azuma J.** (1996) Two chains of rhamnogalacturonan ii are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110: 1017.
- Lazo G.R., Stein P.A. and Ludwig R.A.** (1991) A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*. 9: 963–967.
- Leitão L., Prista C., Moura T.F., Loureiro-Dias M.C. and Soveral G.** (2012) Grapevine Aquaporins: Gating of a Tonoplast Intrinsic Protein (TIP2;1) by Cytosolic pH. *PLoS One*. 7, e33219.

- Liu Q., Wang H., Zhang Z., Wu J., Feng Y. and Zhu Z.** (2009) Divergence in function and expression of the NOD26-like intrinsic proteins in plants. *BMC Genomics*. 10: 313.
- Loqué D., Ludewig U., Yuan L. and von Wirén N.** (2005) Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol*. 137: 671-680.
- Luu D.T. and Maurel C.** (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ*. 28: 85-96.
- Mahdieh M. and Mostajeran A.** (2009) Abscisic acid regulates root hydraulic conductance via aquaporin expression modulation in *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol*. 166: 1993-2003.
- Maurel C., Tacnet F., Güçlü J., Guern J. and Ripoche P.** (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 7103-7108.
- Medina-Escobar N., Cárdenas J., Moyano E., Caballero J.L. and 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 Mol. Biol*. 34: 867-877.
- Medina-Puche L., Cumplido-Laso G., Amil-Ruiz F., Hoffmann T., Ring L., Rodríguez-Franco A., Caballero J.L., Schwab W., Muñoz-Blanco J. and Blanco-Portales R.** (2014) MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoids/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *J. Exp. Bot*. 65: 401-417.
- Mitani N., Yamaji N. and Ma J.F.** (2008) Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, LsiI. *Pflugers Arch*. 456: 679-686.
- Molina-Hidalgo F.J., Franco A.R., Villatoro C., Medina-Puche L., Mercado J.A., Hidalgo M.A., Monfort A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J. and Blanco-Portales R.** (2013) The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific *rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1)* gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell walls middle lamellae. *J. Exp. Bot*. 64:1471-1483.
- Moyano-Cañete E., Bellido M.L., García-Caparrós N., Medina-Puche L., Amil-Ruiz F., González-Reyes J.A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J. and Blanco-Portales R.** (2013) *FaGAST2*, a strawberry ripening-related gene, acts together with *FaGAST1* to determine cell size of the fruit receptacle. *Plant Cell Physiol*. 54: 218-236.
- Muñoz C., Hoffmann T., Escobar N.M., Ludemann F., Botella M.A., Valpuesta V. and Schwab W.** (2010) The strawberry fruit *Fra a* allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Mol. Plant*. 3: 113-124.
- Muñoz C., Sanchez-Sevilla J.F., Botella M.A., Hoffmann T., Schwab W. and Valpuesta V.** (2011) Polyphenol composition in the ripe fruits of *fragaria* species and transcriptional analyses of key genes in the pathway. *J. Agric. Food Chem*. 59: 12598-12604.
- Mut P., Bustamante C., Martínez G., Alleva K., Sutka M., Civello M. and Amodeo G.** (2008) A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening. *Physiol. Plant*. 132: 538-551.
- Nambara E. and Marion-Poll A.** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol*. 56: 165-185.
- Nelson, B., Cai, X. and Nebenfuhr, A.** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localisation studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J*. 51: 1126-1136.

- Noronha H., Agasse A., Martins A.P., Berry M.C., Gomes D., Zarrouk O., Thiebaud P., Delrot S., Soveral G., Chaumont F. and Gerós H.** (2013) The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *J. Exp. Bot.* 65: 981-993.
- O'Neill M.A., Eberhard S., Albersheim P. and Darvill A.G.** (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294: 846-849.
- O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P. and Darvill A.G.** (2004) Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 109-139.
- Pandey B., Sharma P., Pandey D.M., Sharma I. and Chatrath R.** (2013) Identification of new aquaporin genes and single nucleotide polymorphism in bread wheat. *Evol. Bioinform.* 9: 437-452.
- Parent B., Hachez C., Redondo E., Simonneau T., Chaumont F. and Tardieu F.** (2009) Drought and abscisic acid effects on aquaporins content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiol.* 149: 2000-2012.
- Pedersen S.B.** (2001) Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the iCycler iQ™ detection system. *BioRadiations (BioRad)*. 107: 10-11.
- Perkins-Veazie P.** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic. Rev.* 17: 267-297.
- Picaud S., Becq F., Dédaldéchamp F., Ageorges A. and Derot S.** (2003) Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry. *Funct. Plant Biol.* 30: 621-630.
- Qiu W., Park J.W. and Scholthof H.B.** (2002) Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 269-280.
- Raab T., López-Ráez J.A., Klein D., Caballero J.L., Moyano E., Schwab W. and Muñoz-Blanco J.** (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell.* 18: 1023-1037.
- Redondo-Nevado J., Moyano E., Medina-Escobar N., Caballero J.L. and Muñoz-Blanco J.** (2001) A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). *J. Exp. Bot.* 52: 1941-1945.
- Reuscher S., Akiyama M., Mori C., Aoki K., Shibata D. and Shiratake K.** (2013) Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS One.* 8: e79052.
- Rodrigo M.J., Alquezar B. and Zacarias L.** (2006) Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* 57: 633-643.
- Rougé P. and Barre A.** (2008) A molecular modeling approach defines a new group of Nodulin 26-like aquaporins in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 60-66.
- Ruiz-Lozano J.M., del Mar Alguacil M., Barzana G., Vernieri P. and Aroca R.** (2009) Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Mol. Biol.* 70: 565-579.
- Sabir F., Leandro M.J., Martins A.P., Loureiro-Dias M.C., Moura T.F, Soveral G. and Prista C.** (2014) Exploring three PIPs and three TIPs of grapevine for transport of water and atypical substrates through heterologous expression in aqy-null yeast. *PLoS One.* 9: e102087.

- Saladiè M., Matas A.J., Isaacson T., Jenks M.A., Goodwin S.M., Niklas K.J., Xiaolin R., Labavitch J.M., Shackel K.A., Fernie A.R., Lytovchenko A., O'Neill M.A., Watkins C.B. and Rose J.K.** (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* 144: 1012–1028.
- Schnurbusch T., Hayes J., Hrmova M., Baumann U., Ramesh S, Tyerman S, Langridge P. and Sutton T.** (2010) Boron toxicity tolerance through reduced expression of the multifunctional aquaporin HvNIP2;1. *Plant Physiol.* 153: 1706-1715.
- Seki M., Umezawa T., Urano K. and Shinozaki K.** (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 296-302.
- Seo M, and Koshiha T.** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 41-48.
- Siefritz F., Otto B., Bienert G.P., van der Krol A. and Kaldenhoff R.** (2004) The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *Plant J.* 37: 147-155.
- Soveral G., Madeira A., Loureiro-Dias M.C. and Moura T.F.** (2007) Water Transport in Intact Yeast Cells as Assessed by Fluorescence Self-Quenching. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2341–2343.
- Sreedharan S., Shekhawat U.K. and Ganapathi T.R.** (2013) Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnol. J.* 11: 942-952.
- Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P. and Jap B.K.** (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 414: 872-878.
- Surbanovski N., Sargent D.J., Else M.A., Simpson D.W., Zhang H. and Grant O.M.** (2013). Expression of *Fragaria vesca* PIP Aquaporins in Response to Drought Stress: PIP Down-Regulation Correlates with the Decline in Substrate Moisture Content. *PLOs one.* 8: e74945.
- Symons G.M., Chua Y.J., Ross J.J., Quittenden L.J., Davies N.W. and Reid J.B.** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J. Exp. Bot.* 63: 4741-4750.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wiren N. and Fujiwara T.** (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell.* 18: 1498-1509.
- Thomas T.R., Matthews M.A. and Shackel K.A.** (2006) Direct in situ measurement of cell turgor in grape (*Vitis vinifera* L.) berries during development and in response to plant water deficits. *Plant, Cell, Environ.* 29: 993–1001.
- Tunggoen K., Viboonjun U., Kongsawadworakul P., Katsuhara M., Julien J.L., Sakr S., Chrestin H. and Narangajavana J.** (2011) Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporins genes. *J. Plant Physiol.* 168: 253-262.
- Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E. and Smith J.A.C.** (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 50: 1055-1071.
- Wada H., Shackel K. and Matthews M.** (2008) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: apoplastic solute accumulation accounts for pre-veraison turgor loss in berries. *Planta.* 227: 1351-1361.

- Wada H., Matthews M. and Shackel K.** (2009) Seasonal pattern of apoplastic solute accumulation and loss of cell turgor during ripening of *Vitis vinifera* fruit under field conditions. *J. Exp. Bot.* 60: 1773-1781.
- Wallace I.S. and Roberts D.M.** (2004) Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* 135: 1059-1068.
- Wallace I.S. and Roberts D.M.** (2005) Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44: 16826-16834.
- Weaver C.D., Shomer N.H., Louis C.F. and Roberts D.M.** (1994) Nodulin 26, a nodule specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel. *J. Biol. Chem.* 268: 17858-17862.
- Weig A.R. and Jakob C.** (2000) Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* 481: 293-298.
- Weigel D. and Glazebrook J.** (2006) *In planta* transformation of *Arabidopsis*. *CSH Protocols.* doi: 10.1101/pdb.prot4668.
- Xu Y., Hu W., Liu J., Zhang J., Jia C., Miao H., Xu B. and Jin Z.A.** (2014) Banana aquaporin gene, MaPIP1;1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biol.* 8: 14-59.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781-803.
- Yanoff A., Sigaut L., Marquez M., Alleva K., Pietrasanta L.I. and Amodeo G.** (2014) Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 231-236.
- Zardoya R.** (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* 97: 397-414.
- Zhang M., Yuan B. and Leng P.** (2009) The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 60: 1579-1588.
- Zhang D.Y., Ali Z., Wang C.B., Xu L., Yi J.X., Zu Z.L., Liu X.Q., He X.L., Huang Y.H., Khan I.A., Trethowan R.M. and Ma H.X.** (2013) Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max.* L). *PLoS One.* 8: e56312.
- Zhou S., Hu W., Deng X., Ma Z., Chen L., Huang C., Wang J., He Y., Yang G. and He G.** (2012) Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS One.* 7: e52439.

CHAPTER 3

The strawberry fruit FaDOF2 transcription factor interacts with FaEOBII in regulating eugenol production through FaEGS2

This chapter has been submitted to Plant Physiology as:

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Cañete-Gómez CJ, Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Solano R, Caballero JL, Rodríguez-Franco A, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Moyano-Cañete E. 2016. The strawberry fruit FaDOF2 transcription factor interacts with FaEOBII in regulating eugenol production through FaEGS2. *Plant Physiology*.

Footnote:

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaDOF2* (KP100112).

CHAPTER 3

The strawberry fruit FaDOF2 transcription factor interacts with FaEOBII in regulating eugenol production through FaEGS2**Abstract**

The role played by transcription factors in the regulation of strawberry fruit ripening process is scant. Using a transcriptomic approach, we have identified and functionally characterized FaDOF2, a DOF-type transcription factor. The *FaDOF2* expression was ripening-related and fruit receptacle-specific, although high expression values were also found in petals. This *FaDOF2* expression pattern correlated with eugenol content, a phenylpropanoid volatile, in both fruit receptacle and petals. The *FaDOF2* expression was repressed by auxins, and activated by abscisic acid (ABA) during the fruit development and ripening process, respectively. When the *FaDOF2* expression was silenced in ripe strawberry receptacles, the expression of *FaEOBII* and *FaEGS2*, two key genes involved in eugenol production, were down-regulated. These fruits showed a concomitant decrease in eugenol content, which confirmed that FaDOF2 is a transcription factor involved in eugenol production in ripe fruit receptacles. By using the yeast two-hybrid system, we have demonstrated that FaDOF2 interacts with FaEOBII, a eugenol production regulator reported in a previous study. Our results indicate that the mutual interaction between *FaEOBII* and *FaDOF2* would determine a fine-tuning of the expression of key genes that are responsible for eugenol production. Additionally, *FaEOBII* expression, but not *FaDOF2*, was under control of FaMYB10, a master R2R3 MYB transcription factor regulating both early and late biosynthetic genes from the flavonoid/phenylpropanoid pathway. These results provide evidences that *FaDOF2* plays a subsidiary regulatory role with *FaEOBII* of the expression of those structural genes that control eugenol production. Taken together, our results provide new insight in regulation of the volatile phenylpropanoid pathway in ripe strawberry receptacles.

Introduction

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) is one of the most important soft fruit crops in the world whose quality is largely tied to the ripening process. The latter involves biochemical and physiological changes occurring in the last stages of fruit development and maturation, such as cell wall modification, conversion of starch to sugars, anthocyanin pigments biosynthesis, accumulation of flavour and aromatic volatiles, as well as an increase in polyphenols and other antioxidant compounds (Seymour et al., 2013; Cherian et al., 2014). All these changes involve the expression of many ripening-related genes under the control of a regulatory network that remains poorly understood in non-climacteric fruits, such as strawberries. Most studies have focused on hormonal control, and it has been widely accepted that strawberry does not evidence dramatic changes in respiration, with ethylene production remaining at a basal level (Symons et al. 2012; Cherian et al., 2014). Nevertheless, recent evidence suggests that both ethylene and gibberellins may play a secondary role in the strawberry fruit ripening process (Trainotti et al., 2005; Merchante et al., 2013; Sun et al., 2013). Abscisic acid (ABA) has long been deemed an inducer of strawberry fruit ripening, but new research data have shown that ABA is a major regulator of the ripening process (Li et al., 2015). Moreover, there is evidence that ABA may interact together with sucrose, to regulate strawberry fruit ripening (Cherian et al., 2014).

Transcription factors (TFs) are essential for gene expression regulation in plants. However, knowledge related to the regulatory role played by different TFs along the strawberry fruit ripening process is scarce. Thus far, two TFs, FaMYB1 and FaMYB10, which regulate biosynthesis of phenylpropanoid/flavonoids/anthocyanins in ripe fruit receptacles, have been functionally characterized (Aharoni et al., 2001; Lin-Wang et al., 2010; Medina-Puche et al., 2014). Additionally, it has also been reported that FaMYB10 may also regulate the expression of structural genes belonging to the biochemical biosynthesis pathway that produces phenylpropanoid volatiles (Medina-Puche et al., 2014). Recently, another MYB TF, *FaEOBII*, has been identified as a positive regulator of the metabolic pathway in ripe receptacles that originates production of phenylpropanoid volatile eugenol, a volatile phenylpropene that is synthesized by fruits or flowers contributing to their aroma and plays a role as floral attractants for pollinators (Koeduka et al., 2006). *FaEOBII* would act through the transcriptional regulation of the *FaCAD1* and *FaEGES2* gene expression. Both genes code enzymes, a cinnamyl alcohol dehydrogenase and a eugenol synthase, respectively, that are part of this metabolic pathway (Medina-Puche et al., 2015). Moreover, a C-type MADS-box gene (*SHATTERPROOF*-like, *FaSHP*) has been proposed as a modulator of ripening genes in strawberry that may act either directly or indirectly through other transcription factors (Daminato et al., 2013). On the other hand, four TFs, FaMYB9/FaMYB11, FabHLH3 and FaTTG1, have been described as positive

regulators of proanthocyanidins (PAs) biosynthesis, which are the main flavonoids produced in unripe strawberry (Schaart et al., 2013).

DOF transcription factors (*DOF*-TFs) constitute one of the multigene families of plant-specific TFs. Genome analyses have identified a number of *DOF* genes that vary depending on the species. In *Arabidopsis*, rice, wheat and tomato 36, 30, 31 and 34 *DOF* genes have been found respectively (Lijavetzky et al., 2003; Shaw et al., 2009; Cai et al., 2013; ChengHui et al., 2013; SugHan et al., 2014), whereas 26 have been determined in barley (Moreno-Risueño et al., 2007), 28 in sorghum (Kushwaha et al., 2011), 27 in the grass *Brachypodium distachyon* (Hernando-Amado et al., 2012), 19 in the moss *Physcomitrella patens*, 35 in potato (Venkatesh and Park, 2015), 76 in Chinese cabbage (Ma et al., 2015), and a single *DOF* gene in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* genome (Shigyo et al., 2007; Lucas-Reina et al., 2015).

It has been demonstrated that *DOF*-TFs physiologically regulate many complex and specific plant processes or metabolic pathways. Processes associated with carbon assimilation, light-responsiveness (Lucas-Reina et al., 2015), seed storage protein accumulation, development (Gaur et al., 2011; Rueda-Romero et al., 2012; Boccaccini et al., 2014; Noguero et al., 2015), seed germination (Santopolo et al., 2015), response to phytohormones (Gupta et al., 2015), plant growth, flowering (Ishida et al., 2014; Fornara et al., 2015), guard cell development (Cominelli et al., 2011; Negi et al., 2013), vascular development, and functioning (Le Hir and Bellini, 2013; Konishi and Yanagisawa, 2007 and 2015; Konishi et al., 2015), as well as in response to abiotic and biotic stresses (Lijavetzky et al., 2003; ChengHui et al., 2013; SungHan et al., 2014; Gupta et al., 2015; Ma et al., 2015; Sasaki et al., 2015). Recently, Noguero et al. (2013) have reviewed the processes by which *DOF* play crucial regulatory roles in many plant processes. They divided these processes into three broad categories: seed development, tissue differentiation and metabolism regulation, although they indicated that certain *DOFs* play roles overlapping those categories (Gupta et al., 2015). Nevertheless, the biological function of many *DOFs* is unknown.

DOF-TFs can serve as transcriptional activators or repressors (Yaksigawa, 2002; Rueda-López et al., 2013; Ishida et al., 2014; Franco-Zorrilla et al., 2014; Santopolo et al., 2015). In this sense, it was demonstrated that *AtDOF4;2* gene positively or negatively influences the phenylpropanoid metabolism in an environmental and tissue-specific manner in *Arabidopsis thaliana* (Skircyk et al., 2007). Based on the environmental conditions or the tissue type, this TF positively influences production of hydroxycinnamic acids or negatively affects flavonoid biosynthesis (Skircyk et al., 2007). Similarly, maritime pine (*Pinus pinaster*) PpDof5 transcription factor, which controls ammonium assimilation for glutamine biosynthesis in conifers, is able to

differentially trans-regulate transcription of both GS1a and GS1b promoters (two different glutamine synthetases). Thus, PpDof5 activated transcription of the GS1b promoter and, in contrast, behaved as a transcriptional repressor of the GS1a promoter (Rueda-López et al., 2008).

Previous transcriptomic analyses performed in our research group allowed us to identify two DOF TFs (*gene32187* and *gene32526*) whose expression differentially changed throughout strawberry fruit-receptacle development and ripening. This study presents the molecular and functional characterization of the ripening-related *FaDOF2* gene from *Fragaria* × *ananassa*. *FaDOF2* is expressed in the ripening and senescent stages of receptacle fruit as well as petals. Molecular and physiological studies show that this TF is involved in the regulation of endogenous eugenol production, a volatile phenylpropanoid in ripe fruit receptacles.

Results

Transcriptomic analyses show that *FaDOF2* is a ripening-related gene

A custom-made oligo-based microarray platform, FraGenomics35K, was used to perform a comparative analysis among the transcriptomes of green (G2-stage) and full red-ripe strawberry fruit receptacles (R-stage). This study identified 25 putative DOF TFs genes all of which were expressed in both the G2 and R, *Fragaria* × *ananassa*, strawberry fruit receptacle transcriptomes (Table S1).

Of these 25 *FaDOF* TFs, only two of them were differentially expressed when comparing green and red stage fruit transcriptomes. The *gene32187* (*FaDOF1*) expression was down-regulated, while the *gene32526* (*FaDOF2*) expression was up-regulated in red-ripe receptacle transcriptomes, which suggests that they may be involved in the regulation of different processes related to fruit receptacle development and ripening. In view of our interest in the strawberry ripening process in *F.* × *ananassa*, we proceeded to functionally characterize the DOF transcription factor corresponding to *gene32526*, hereinafter named *FaDOF2*. The expression pattern of this *DOF* transcription factor was ripening-related and fruit-specific and showed a high amount of transcript within the red-ripe receptacle transcriptome.

Isolation and sequence analysis of the *FaDOF2* gene and protein

The full-length cDNA sequence of the *FaDOF2* (KP100112) gene was amplified from *Fragaria* × *ananassa* cv Camarosa. The sequence of the 906 bp cDNA isolated was 97% identical to the

gene32526 from *F. vesca*, encoding a 301 amino acid protein, and has a predicted molecular mass of 33.7 KDa. The corresponding amino acid sequence showed high sequence homology with that of other genes encoding DOFs from higher plants that ranged from 44% to 60% (Figure S1 & S2).

Bioinformatic analysis of FaDOF2 deduced protein sequence showed the presence of a conserved DOF DNA-binding domain constituted by 52 amino acids-located in the-N-terminal region of the protein. This domain includes the conserved four cysteine residues, CX₂CX₂₁CX₂C, separated by a loop of 21 amino acids, which are involved in the formation of the zinc finger sequence that is essential for DNA-binding activity (Yanagisawa et al., 2004; Umemura et al., 2004). Besides, the two conserved aromatic residues, Tyr⁷⁰ and Trp⁷¹, which are important for DNA binding at the C-terminal of this region, were also found in *FaDOF2* (Shimofurutani et al., 1998; Umemura et al., 2004) (Figure S2).

FaDOF2 protein is located in the nucleus

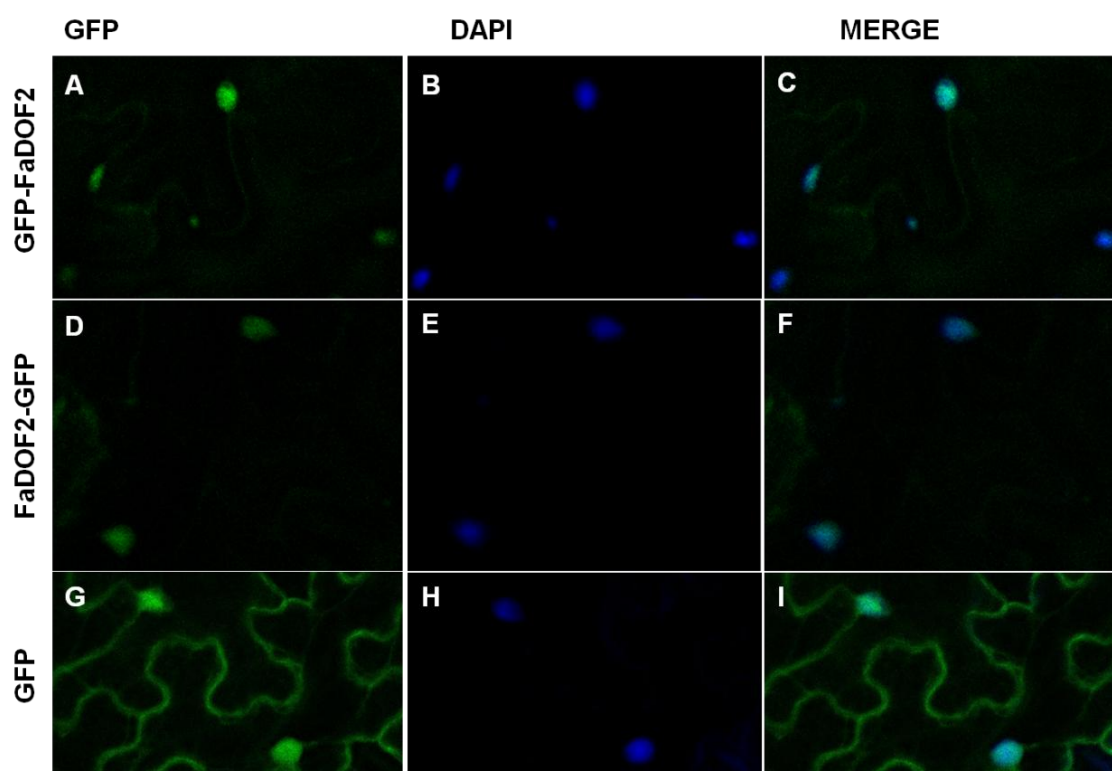


Figure 1: Subcellular localization of the FaDOF2 protein in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Nicotiana benthamiana* leaves were agroinfiltrated with translational constructs *35S::GFP:FaDOF2*, *35S::FaDOF2:GFP* and with *35S::GFP* as control. Leaves were infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid *35S::GFP:FaDOF2*. (A to C). Infiltrated with *35S::FaDOF2::GFP*. (D to F). Infiltrated with *35S::GFP*. (G to I). Merged image of both agroinfiltrations. GFP: green fluorescent protein; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (nuclei dye); MERGE: merged view of the GFP and DAPI images.

By using several public protein location predictions platforms and tools, FaDOF2 was predicted to be located into the nucleus. Bioinformatic analyses of FaDOF2 amino acid sequence show us that the DOF atypical bipartite NLS motif, with a 26 amino acid long linker between its flanking basic regions (Krebs et al., 2010), was present in the strawberry FaDOF2 protein (Figure S2; Figure S3). It has been demonstrated that this NLS directs *Arabidopsis* DOF proteins into the cell nucleus (Krebs et al., 2010), which suggests a subcellular localization of FaDOF2 into the nucleus.

To confirm the bioinformatic FaDOF2 localization prediction, its full length coding sequence was fused to GFP at N- or C-terminal region (FaDOF2::GFP or GFP::FaDOF2 respectively) under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. The fusion protein was transiently expressed in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*, and the subcellular location of the recombinant FaDOF2-GFP protein was determined by confocal microscopy. As expected, with both binary constructions, the fluorescent signal was detected exclusively in nucleus and colocalized with nucleic-specific DAPI stain (Figure 1), which corroborates the functionality of these NLS bipartite motif.

High throughput transcriptomic analysis shows that FaDOF2 is a key regulator of the volatile benzenoid/phenylpropanoid pathway

The potential regulatory role played by *FaDOF2* on the expression of genes involved in the strawberry fruit receptacle ripening-related process was assessed through transcriptomic studies (Tables S2 and S3). To this end, expression of *FaDOF2* gene was transiently down-regulated in fruit receptacles by RNAi approach in several strawberry fruits. The degree of *FaDOF2* gene expression silencing was analysed in these transgenic fruits. Only fruits where a percentage of silencing above 95% was obtained were selected for transcriptomic analysis (Figure 2). For comparative analysis, agroinfiltrated control fruits with the empty pFRN vector were used. The work was focused on the most clearly up- and down-regulated genes by choosing a 2.0-fold cutoff, a corrected *P*-value < 0.05 and an intensity cutoff >700 a.u.i. (Figure S4). The microarray analysis revealed that, in *FaDOF2*-silenced fruits, only the expression of 10 out of the 34616 putative genes represented in the array were down-regulated, whereas no transcripts were up-regulated. As expected, the expression of all these genes was also ripening-induced (Table 1). Interestingly, among the genes whose expression was reduced in *FaDOF2*-silenced fruit receptacles, the gene encoding *FaEOBII* TF (*gene28435*) as well as the gene corresponding to a ripening-related eugenol synthase 2 (*FaEGS2*; *gene25260*) were found. Down-regulation of these genes was corroborated by qRT-PCR. The expression of FaMYB10 was also reported in these fruits. (Figure 2). Besides, in *FaEOBII*-silenced receptacles, the *FaDOF2* expression was

also observed, which indicates that there is some type of co-regulation between both transcription factors (Figure 3A). In *FaMYB10*-silenced receptacles, *FaDOF2* expression remained unchanged (Figure 3B). *FaEGS2* gene encodes one of last enzymes in the biosynthesis pathway of eugenol in strawberry fruit receptacles. Considering the down-regulation of the *FaEGS2* gene expression in *FaDOF2*-silenced receptacles, the eugenol content in *FaDOF2*-silenced fruits was also analysed. Results showed a significant decrease of eugenol content (Figure 4A) in *FaDOF2*-silenced fruits, while anthocyanin content remained unchanged (Figure 4B). These results indicate that *FaDOF2*, as previously shown for *FaEOBII* (Medina-Puche et al., 2015), is involved in eugenol biosynthesis in ripe strawberry fruit receptacles, probably through regulation of *FaEGS2* expression.

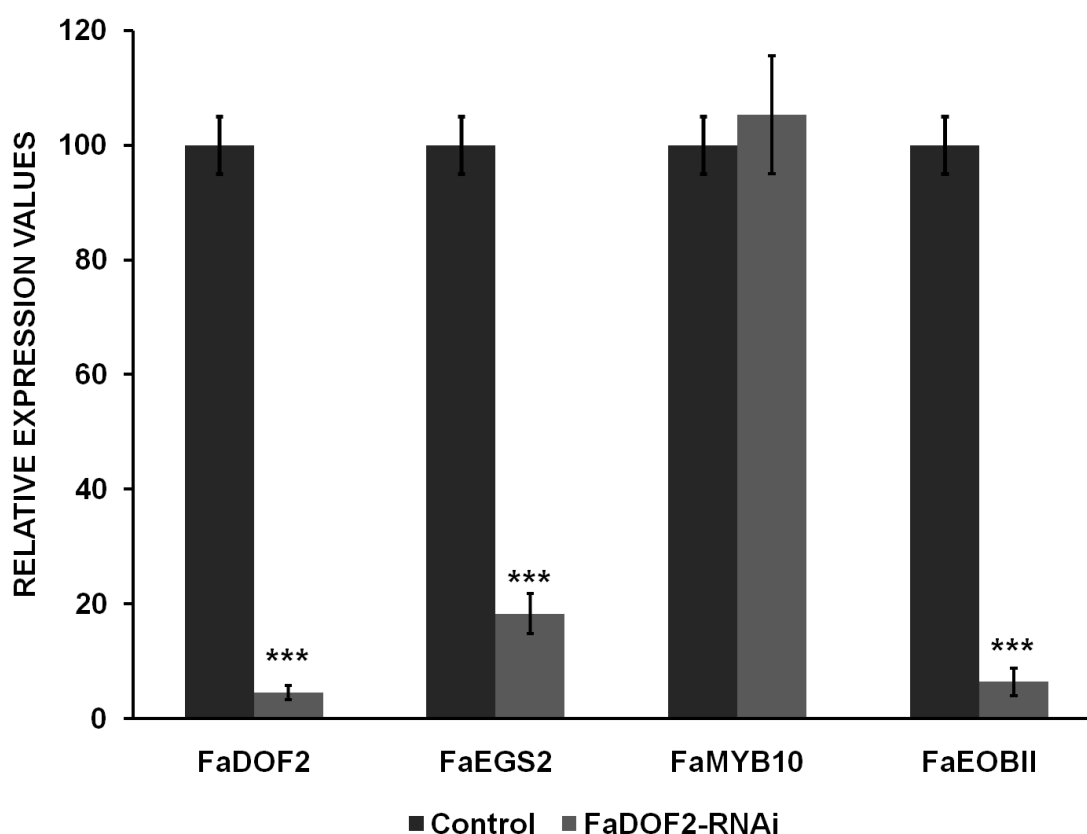


Figure 2: Analysis by qRT-PCR of *FaDOF2*, *FaEGS2*, *FaMYB10* and *FaEOBII* gene expression in transgenic *FaDOF2*-RNAi strawberry fruits (*F. x ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaDOF2* construct. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (***) p-value < 0.001.

Table 1: Microarray data from transcriptomic comparison between transgenic transiently-silenced *FaDOF2* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2011).

gene ID	RNAi-FaDOF1 (fold change)	p-value	Red vs. Green	p-value	a.u.i.	Annotation	Species	e-value	Accession
DOWN regulated									
gene32526	10,127	6.29E-03	41.029 up	1.19E-04	2,268,31	DOF zinc finger protein	<i>Medicago truncatula</i>	6.00E-49	XM_003602109
gene28435	9,474	9.44E-04	25.21 up	1.57E-03	3,198,54	MYB TF emission of benzenoids II (FaEOBII)	<i>Fragaria × ananassa</i>	0	KM099230
gene25260	5,446	9.54E-03	207.001 up	1.15E-04	10,732,21	eugenol synthase 2 (FaEGS2)	<i>Fragaria × ananassa</i>	4.00E-148	KF562266.1
gene24048	5,102	7.76E-04	7.702 up	2.64E-03	1,059,25	Multidrug and toxin extrusion protein (MATE6)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00E-134	NM_104614.4
gene01348	4,430	3.55E-02	4.271 up	2.00E-03	2,425,10	Pentatricopeptide repeat-containing protein	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0	XM_002873600
gene26804	3,761	1.51E-02	14.687 up	1.47E-04	2,735,45	no homology			
gene05525	3,558	2.12E-02	15.142 up	2.53E-03	1,037,39	Beta-amyrin synthase	<i>Malus x domestic</i>	0	AB055512.1
gene12176	3,318	1.84E-03	2.379 up	1.86E-03	1735,88	VERNALIZATION INSENSITIVE 3	<i>Glycine max</i>	0	XM_003544200
gene16762	3,122	5.56E-03	10.131 up	5.24E-04	862,10	UDP-glucose:sterol 3-O-glucosyltransferase	<i>Withaniasomnifera</i>	0	EU342378.2
gene24860	2,721	5.73E-04	8.701 up	1.53E-04	1,318,37	Trehalose-phosphate synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0	NM_106505.4

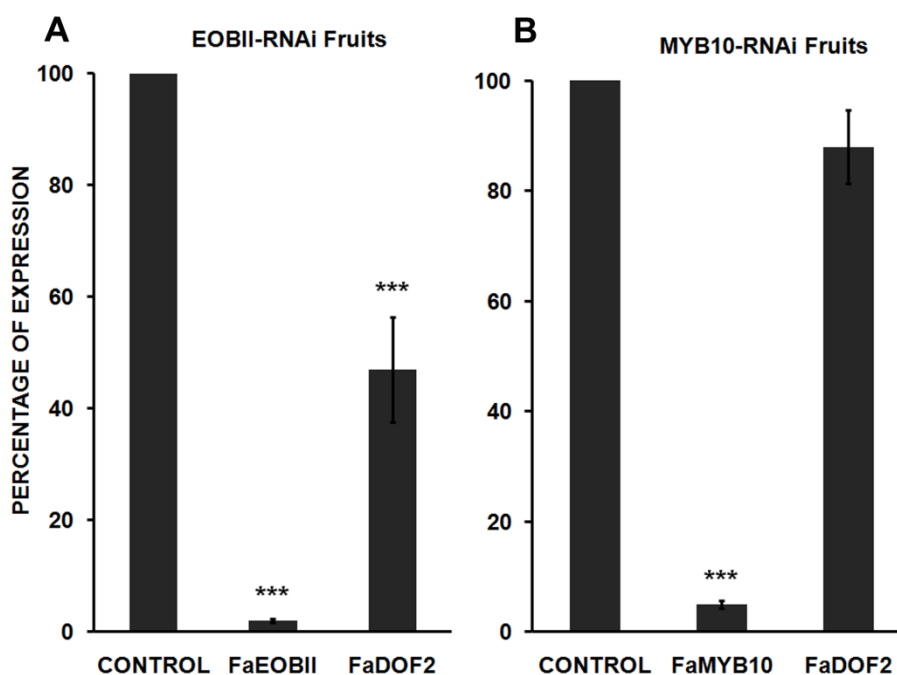


Figure 3: A. Analysis by qRT-PCR of *FaDOF2* and *FaEOBII* gene expression in transgenic *FaEOBII*-RNAi strawberry fruits (*F. x ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaEOBII* construct (Medina-Puche et al., 2015). B. Analysis by qRT-PCR of *FaDOF2* and *FaMYB10* gene expression in transgenic *FaMYB10*-RNAi strawberry fruits (*F. x ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaMYB10* construct (Medina-Puche et al., 2015) Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (***) p-value < 0.001.

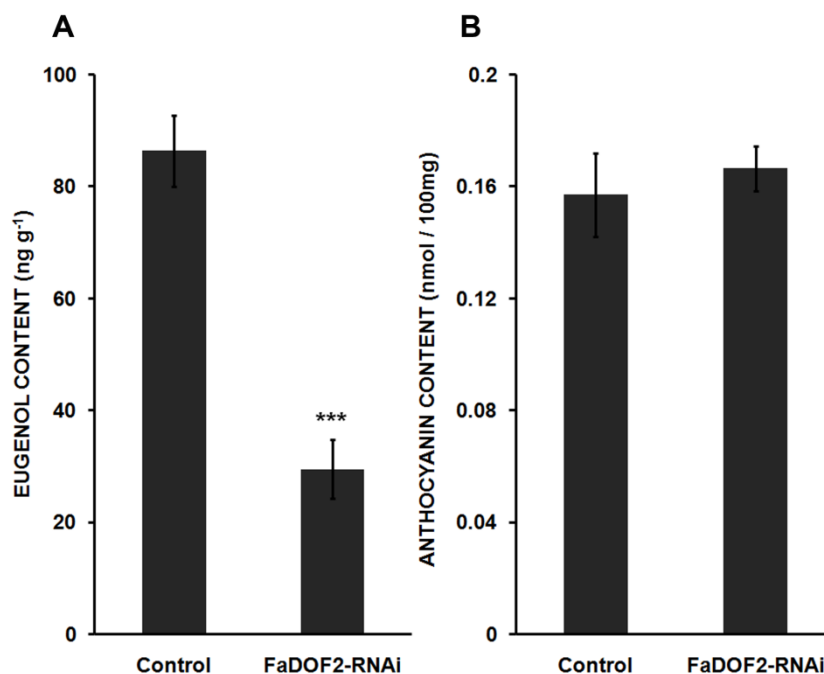


Figure 4: A. GC-MS quantification of eugenol and B. anthocyanin measurements in transiently *FaDOF2* silenced transgenic fruit receptacles (pFRN-*FaDOF2*) with respect to control fruits (pFRN). Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (***) p-value < 0.001.

FaDOF2 binds to DOF-binding sequence *in vitro*

In vitro DNA-binding assays have demonstrated that the core sequence AAAG is essential for DNA recognition of DOF transcription factors (Yanagisawa, 2002). In light of the low complexity of this core sequence and the large number of such motifs that may be found in promoters, we studied the DNA binding FaDOF2 preferences in further depth using Protein Binding Microarray (PBM11), which contains all possible 11-mer sequences (Godoy et al., 2011).

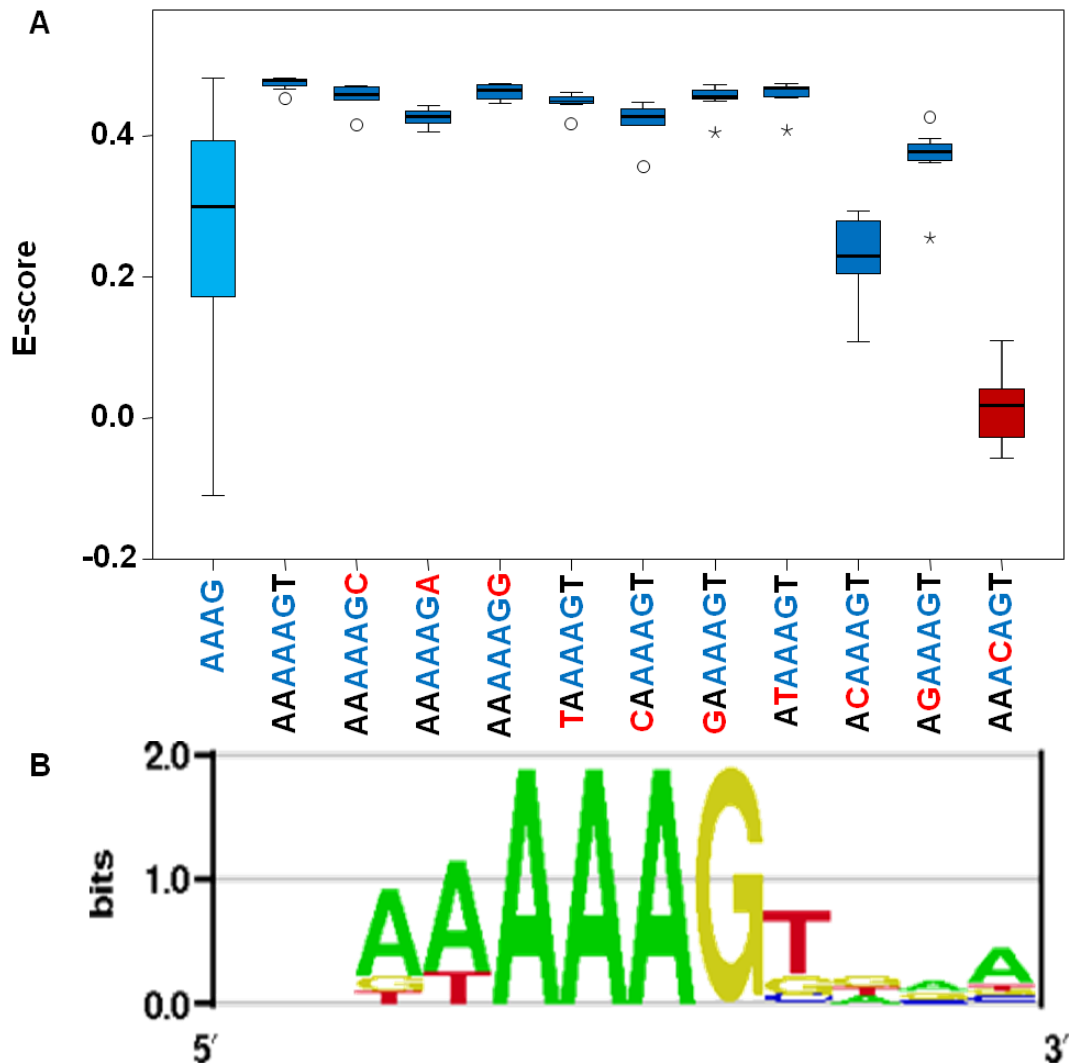


Figure 5: *In vitro* DNA-binding specificity of FaDOF2 protein. A. Box plot of enrichment scores (E-scores) of the motifs containing the indicated 7-mer sequences, as variants of the highest affinity motif AAAAAGTG. The graph also represents the distribution of E-scores of all the motifs containing the core sequence AAAG, as well as the "mutant" variant AAACAGT. The core sequence AAAG is highlighted in blue and the flanking variable nucleotides in red. Boxes represent quartiles 25% to 75%, and the black line represents the median distribution (quartile 50%). Bars indicate quartiles 1% to 25% (above) and 75% to 100% (below). B. Logo representation of the consensus sequence recognized by FaDOF2, obtained upon aligning motifs with E-score > 0.45 shown in Table 1.

Evaluation of the 8-mer sequences recognized with highest affinities revealed ~80 motifs with an enrichment score (E-score) above 0.45—considered as high specific binding—all of which contain the core sequence AAAG (Table S4). These results are very similar to those obtained for other DOF proteins from plants and algae, which suggests that the DNA recognition patterns of DOF factors are broadly preserved in the kingdom (Franco-Zorrilla et al., 2014; Weirauch et al., 2014).

Distribution of the E-scores of the motifs containing the core AAAG suggested that, although necessary, not all the sequences containing the core are recognized with high affinity (Figure 5). In fact, composition of the flanking nucleotides of the core motif determines the binding affinity, as the sequences containing the motif A[A/T]AAAGT are bound with the highest affinity (Figure 5A and B). Although some variants of this consensus sequence are permitted with high affinity, some others result in very poor binding of the FaDOF2 protein (e.g. A[C/G]AAAGT). Alignment of the motifs recognized with high affinity provided the graphical representation shown in Figure 5B.

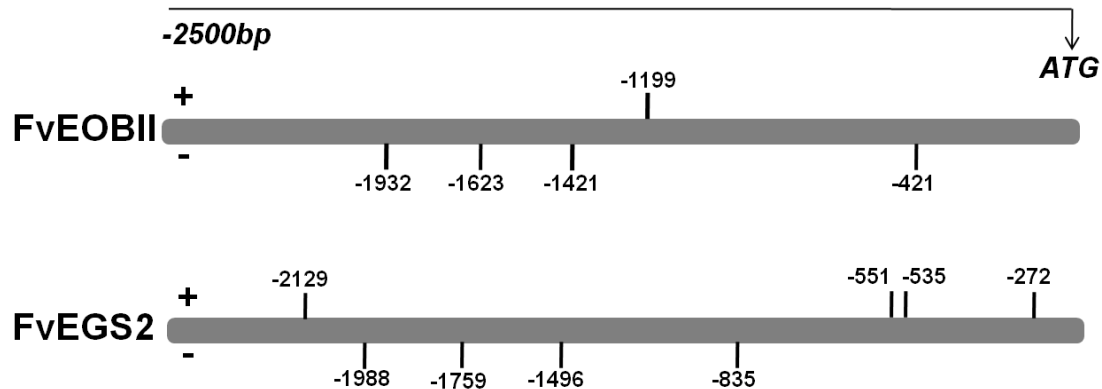


Figure 6: Schematic diagram of *FvEGS2* and *FvEOBII* promoters from *Fragaria vesca*. The upper bar indicates the length of the promoter fragment relative to the ATG codon. The location of the A[A/T]AAAGT motif is shown using black lines in the diagram, and their exact position is indicated on Table S5.

Taken together, these results allowed for defining more precisely the motif A[A/T]AAAGT as the highest affinity sequence recognized by FaDOF2, which will contribute to strengthening prediction of target promoters.

Bioinformatic analysis of promoter sequences located along the down-regulated genes in fruits where the FaDOF2 expression was RNAi-silenced have identified several A[A/T]AAAGT motifs recognized by FaDOF2 (Table S5), which indicates that FaDOF2 could directly regulate those genes. *FvEGS2* and *FvEOBII* promoters present a high number of this motif (Figure 6). *FaEGS2* and *FvEGS2* promoters also present several MBSII, the boxes of which are recognized

by FaEOBII (Medina-Puche et al., 2015). This result would support the idea that FaDOF2 and FaEOBII act synergistically over the *FaEGS2* promoter.

FaDOF2 interacts with FaEOBII, a R2R3 MYB transcription factor that regulates eugenol biosynthesis in red-ripe fruit receptacle.

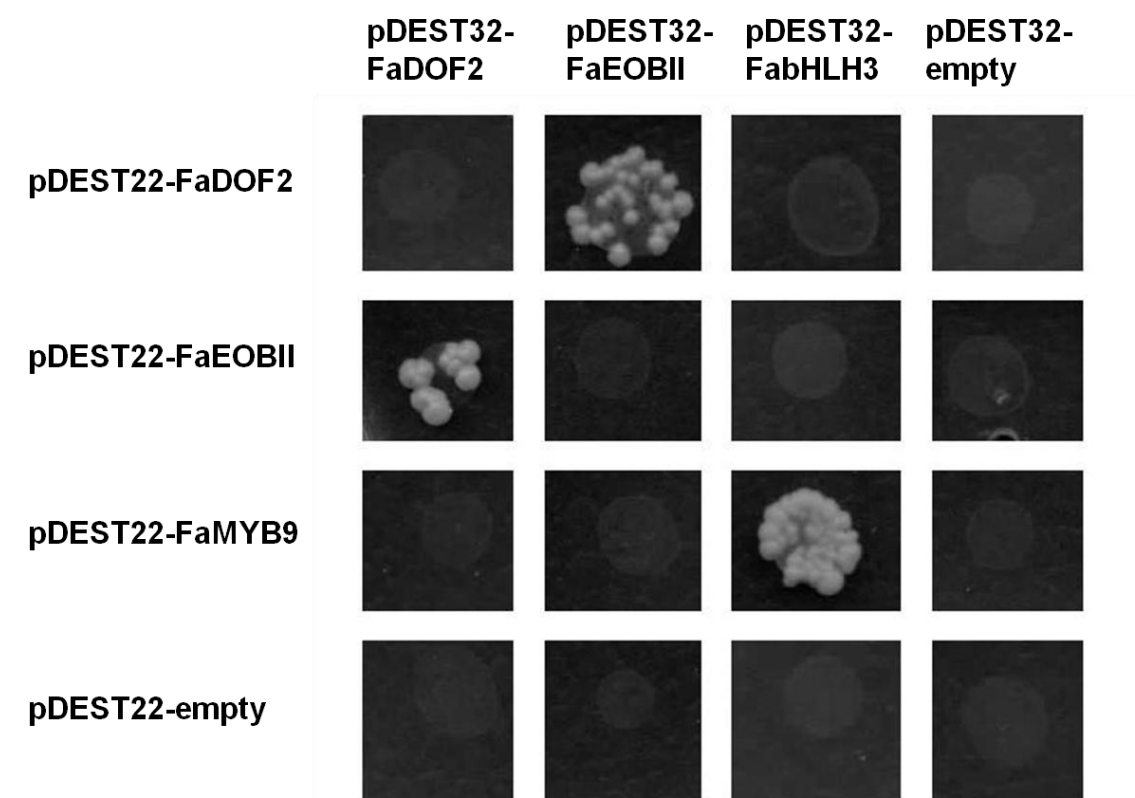


Figure 7: Y2H assay for the interaction between FaDOF2 and FaEOBII. ORFs of the *FaDOF2* and *FaEOBII* TFs were recombined into the bait vector (pDEST32) and prey vector (pDESTTM22). Yeast strains used for the drop test were PJ69-4a (MATa) and PJ69-4α (MATα). pDEST32-FabHLH3 and pDEST22-FaMYB9 were used as positive control. Empty vectors pDEST22 or pDEST32 were also cotransformed into negative controls. The ability of yeast cells to grow on SD medium lacking –Leu-Trp-His-Ade, or –Leu-Trp-His but containing 5mM of 3-aminotriazole (3-AT) was rated as a positive interaction.

It has previously been reported that Dof transcription factors can interact with MYBs TFs (Díaz et al., 2002; Díaz et al., 2005; González-Calle et al., 2014). It was demonstrated that FaEOBII, a R2R3 MYB ripening-related transcription factor, contributes to *FaEGS2* regulation (Medina-Puche et al., 2015); on the other hand, the expression of *FaEGS2* was down-regulated in RNAi-FaDOF2 ripe receptacles, which suggests that both TFs may contribute to the regulation of the *FaEGS2* expression. Yeast-two-hybrid strategy was employed to determine whether FaDOF2 and FaEOBII interact in yeast, by co-expressing a FaDOF2 fused to the GAL4 DNA-binding domain (BD) and a FaEOBII fused to the GAL4 DNA-activating domain (AD), and vice versa.

The ability of yeast cells to grow on synthetic medium lacking Ade, His, Leu, and Trp, or His, Leu, and Trp, and supplemented with 5 mM 3-aminotriazole was rated as a positive interaction. We found growth in the interactions between FaDOF2 and FaEOBII in both vector combinations (Figure 7), as well as the interaction between FabHLH3 and FaMYB9 that was used as a positive control interaction, as expected (Schaart et al., 2012). These results indicated that FaDOF2 is able to physically interact with FaEOBII, which suggests that both transcriptional factors would act synergistically to regulate *FaEGS2* expression and hence eugenol production in red-ripe receptacles.

***FaDOF2* expression is ripening-related and is strongly expressed in fruit receptacles and petals and correlates with eugenol production in both tissues.**

Spatio-temporal expression pattern for *FaDOF2* gene was analysed by qRT-PCR. Results showed that *FaDOF2* was expressed at low level during fruit development (G1 and G3 stages) but drastically increased expression at the ripening and senescent stages (R, OR and SN stages) of fruit receptacle development (Figure 8A). However, no expression was detected in achenes when compared with the expression level observed in red fruit receptacles (Figure 8B). This expression increase was accompanied by a rise of both *FaEGS2* expression and eugenol content in ripe receptacles (Figure S5). In vegetative tissues, such as leaves, crowns, roots or stolons, *FaDOF2* gene was only expressed at a low level (Figure 8C). Additionally, in petals, where the eugenol content was high, *FaDOF2* expression was also highly expressed (Figure 8C; Figure S6). All these expression results indicate that *FaDOF2* regulates such physiological processes as are related to eugenol production in both tissues.

Expression of *FaDOF2* gene is hormonally regulated throughout receptacle fruit growth and ripening

Recent studies have shown that ABA plays an important role in strawberry fruit ripening regulation (Chai et al, 2011; Jia et al., 2011; Li et al., 2015) and that auxin produced by achenes stimulates receptacle growth and subsequently inhibits fruit ripening (Perkins-Veazie, 1995). Additionally, it has been demonstrated that expression of the vast majority of ripening-related genes related to the organoleptic and quality properties of the strawberry fruit were antagonistically regulated by both auxins and ABA. Thus, we decided to study the effect of both hormones on the *FaDOF2* expression. To this end, two independent experiments were carried out by both decreasing the FaNCED1 enzymatic activity and silencing *FaNCED1* expression to reduce the internal content of ABA in fruit receptacle. As expected, a clear decrease in both

endogenous ABA content and *FaDOF2* expression was found (Figure 9A and B). Similarly, it is well known that water stress induces ABA accumulation. For this reason, *FaDOF2* gene expression and ABA content were measured in fruits kept under water stress conditions. After four days, a clear increase in *FaDOF2* expression was detected that correlated with a higher ABA content (Figure 9C)

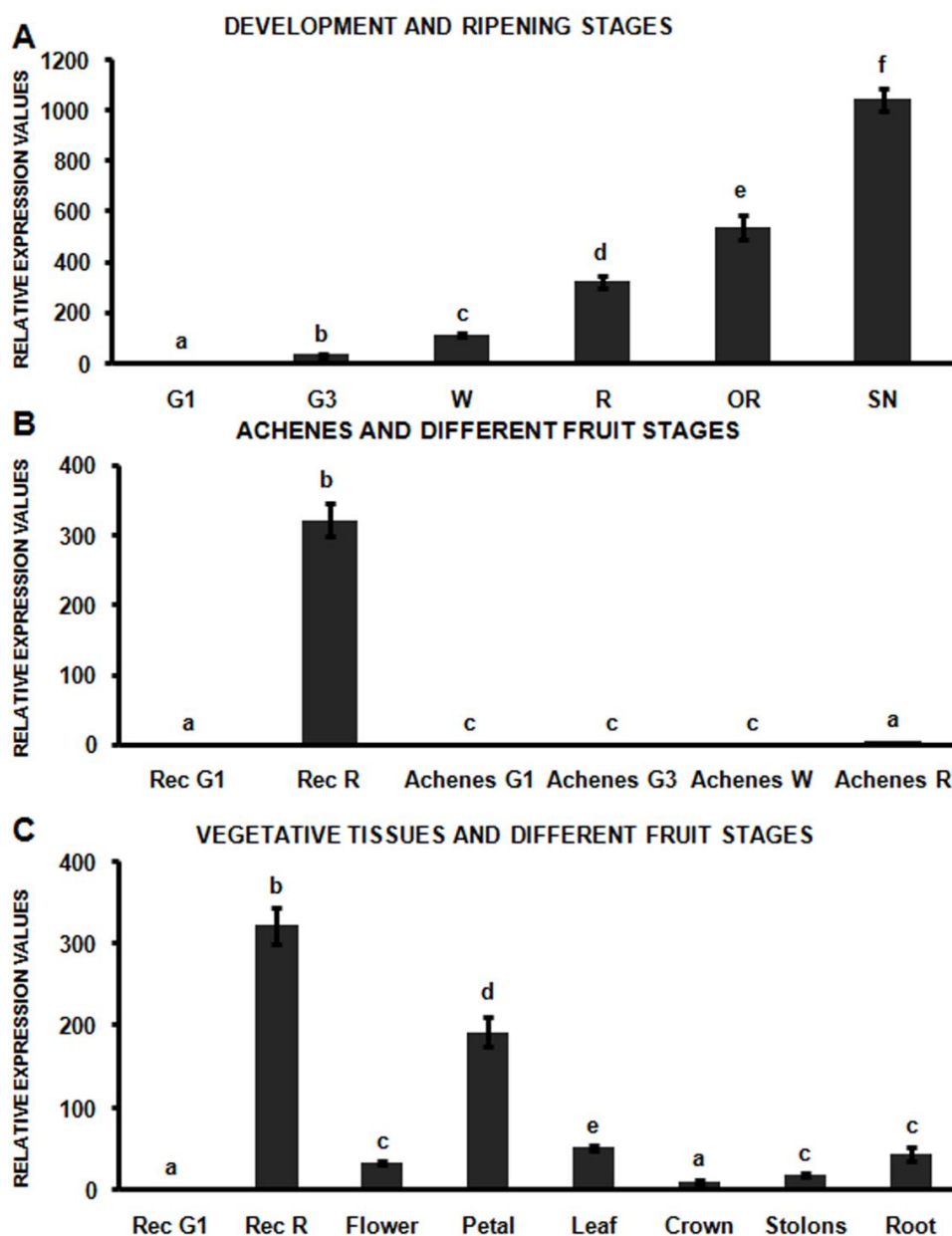


Figure 8: A. Developmental expression of the strawberry *FaDOF2* in fruit receptacles. B. Achenes vs green1 and red receptacles. C. Vegetative tissues vs green1 and red receptacles of *F. × ananassa* cv. Camarosa variety. QRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaDOF2* gene. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SN: senescent stage; REC G1: receptacle G1; REC R: receptacle R. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

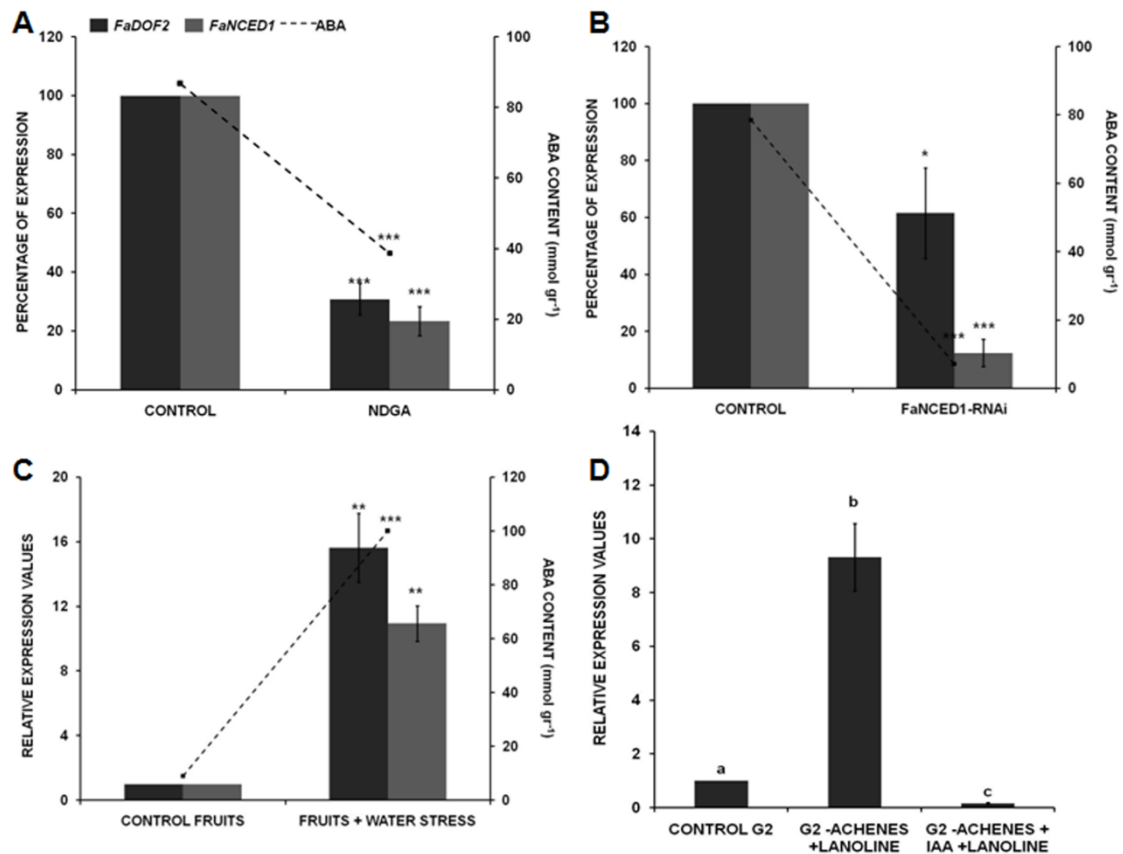


Figure 9: Analysis by qRT-PCR of *FaDOF2* and *FaNCED1* gene expression in (A) strawberry G-W fruits treated with NDGA (B) G-W fruits agroinfiltrated with the *NCED1*-RNAi construct and (C) strawberry G-W fruits under water stress. The dashed line indicates the ABA content in analysed fruits. (A) Control fruit: strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; *NCED1*-RNAi fruits: transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with the *FaNCED1*-pFRN construct. (B) Control fruit: G-W fruit injected with H₂O; Fruit + NDGA: G-W fruits injected with NDGA (100 μ M); both samples were harvested 8 days after beginning of treatment. (C) Control fruit: fruits with their pedicels immersed in MS medium with sucrose. *FaDOF2* and *FaNCED1* gene expression were analysed in fruits, with their pedicels kept in the air. (ABA data also published in Medina-Puche et al., 2015). (D) Analysis of the effects of removing achenes from G2 developing fruits and their treatment with auxins on *FaDOF2* gene expression by qRT-PCR. After auxin treatment, the increase in mRNA value was relative to G2 fruit (control), which was assigned an arbitrary value equal to unity. G2-Control: middle-sized green fruit receptacle; G2-Deachenes: G2 fruit receptacle without achenes for 5 days; G2-Deachenes+IAA: G2 fruit receptacle without achenes plus IAA for 5 days (added at day zero). The cultivar used was *Fragaria* \times *ananassa* cv. Elsanta. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. Statistical significance (A, B, C) with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (***) *p*-value < 0.001; (**) *p*-value < 0.01; (*) *p*-value < 0.05; and (D) by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences (*p* < 0.05, Scheffe post-hoc test).

On the other hand, as shown in Figure 9D, when comparing *FaDOF2* expression in fruit receptacles upon removal of achenes in G2 fruits versus control fruits over five days, an increase in expression was observed. Moreover, this induction was abolished by external IAA application to de-achened fruits, which indicates a negative regulation by auxins.

These results showed that as with the vast majority of genes related to the fruit quality properties, expression of the *FaDOF2* gene is regulated by both ABA and auxin levels in receptacle fruits.

Discussion

DOF proteins are a major plant-specific family of transcription factors present across plant lineages, from green algae to higher angiosperm. They represent a unique class of transcription factor having bifunctional binding activities, with both DNA and proteins (Gupta et al., 2015). These TFs have recently emerged as part of the transcriptional regulatory networks acting on diverse physiological and structural plant-specific processes, including light, phytohormone responses, biotic and abiotic stresses, tissue development, seed development and germination (Gupta et al., 2015). Despite the well-characterized functional role of these TFs in the above-mentioned plant processes, the regulatory function that maybe played by DOFs TFs in the fruit development and ripening process is unknown at present.

Our study reported on the functional characterization of *FaDOF2*, a fruit-receptacle specific and ripening-related strawberry DOF-like gene. Results revealed that *FaDOF2* is a transcription factor involved in eugenol production in ripe fruit receptacles through regulation of the expression of a eugenol synthase gene (*FaEGS2*) and a R2R3 myb TF (*FaEOBII*), both playing a key role in eugenol biosynthesis (Aragüez et al., 2013; Medina-Puche et al., 2015).

FaDOF2 regulates expression of two key genes related to eugenol biosynthesis in strawberry fruit receptacles.

Comparative transcriptomic analyses between the genes expressed in *FaDOF2*-RNAi-silenced receptacles versus control receptacles, and further supported by qRT-PCR validation, showed down-regulation of the expression of a reduced subset of genes (Figure 2; Table 1). They include a clear effect on *FaEGS2* and *FaEOBII* expression, two ripening-related genes. *FaEGS2* gene encodes a eugenol synthase, a key enzyme that catalyses eugenol formation in red receptacles (Aragüez et al., 2013), whilst *FaEOBII* encodes a R2R3 MYB TF that regulates the *FaEGS2* expression and influences eugenol production, a volatile phenylpropanoid (Medina-Puche et al., 2015). In strawberry fruits, two different enzymes, *FaEGS1* and *FaEGS2*, are related to eugenol production (Aragüez et al., 2013). Both enzymes are encoded by two different genes that are differentially expressed during fruit development and ripening. In this regard, it has been shown that *FaEGS1* gene was mostly expressed in green achenes, whereas *FaEGS2* expression was almost restricted to ripe fruit receptacles. The expression pattern of

these genes correlated with eugenol content in both type of tissues (Figure S5 and S7). Otherwise, *FaEOBII* gene encodes a R2R3-MYB transcription factor that regulates expression of *FaEGS2* gene, hence regulating eugenol production in ripe fruit receptacles (Medina-Puche et al., 2015). Our transcriptomic results indicate that *FaDOF2*, similarly to what was described for *FaEOBII*, may also influence eugenol biosynthesis through activation of the *FaEGS2* gene expression. Besides, expression of *FaEOBII* was also under the positive regulation of *FaDOF2*. Involvement of *FaDOF2* in eugenol biosynthesis is also supported by the fact that, in fruit receptacles where the *FaDOF2* gene expression was silenced, a concomitant reduction of *FaEGS2* gene expression and eugenol content was observed, which confirms existence of a direct relationship between *FaDOF2* gene expression and eugenol production (Figure 2 and 4A). These results were very similar to those observed when *FaEOBII* expression was also silenced in ripe fruit receptacles (Medina-Puche et al., 2015). Interestingly, comparative transcriptome analysis performed in ripe fruits, where expression of *FaEOBII* was silenced in ripe receptacles, showed a down-regulation of *FaDOF2* expression (Medina-Puche et al., 2015).

FaDOF2 physically interacts with FaEOBII a R2R3 MYB TF

By using a Y2H hybrid system, we have demonstrated that FaDOF2 can interact with FaEOBII (Figure 7). Protein-protein interactions between DOFs and MYBs proteins have been widely described (Gupta et al., 2015 and references herein contained). For instance, by using the yeast two-hybrid system, the physical interaction between BPPF, a seed-specific DOF protein from barley, and HvGAMYB was demonstrated. HvGAMYB increases BPPF transactivation efficiency, and both TFs are part of a regulatory complex that regulates expression of endosperm-specific genes during seed development (Díaz et al., 2002). Moreover, BPPF can set a ternary complex comprised of BPPF, HvMYBS3 and BLZ2, a bZIP protein (Rubio-Somoza et al., 2006). On the other hand, in banana fruit ripening it has been described that MaDof23 physically interacts with an ethylene-responsive element-binding factor, MaERF9, acting antagonistically to regulate ripening-related genes associated with cell wall and aroma (Feng et al., 2016).

Hierarchical relationships between the network of transcription factors that regulate the shikimate pathway and the production of volatile phenylpropanoids have been well characterized in *Petunia hybrida* petals. This regulatory system involves three R2R3 MYB TFs named PhEOBII, ODO1 (ODORANT1) and EOBI (Verdonk et al., 2005; Schuurink et al., 2006; Spitzer-Rimon et al., 2010; Van Moerkercke et al., 2011; Spitzer-Rimon et al., 2012). PhEOBII directly regulates expression of *ODO1* and *EOBI*, which in turn regulates expression of several structural genes corresponding to the biosynthesis pathway of volatile

phenylpropanoids. However, according to our results, the regulatory system of *FaEGS2* would be different in ripe strawberry receptacles. According to our experimental results, *FaMYB10* would activate expression of *FaEOBII* that subsequently induces expression of *FaCAD1* and *FaEGS2* genes and, as a result, induces eugenol production (Medina-Puche et al., 2015). Additionally, *FaEOBII* would activate *FaDOF2* expression. Both TFs would interact, playing a synergistic role in the transactivation of the *FaEGS2* promoter and thus encouraging eugenol biosynthesis. A regulatory transcriptional loop between *FaDOF2* and *FaEOBII* would probably strengthen the intensity of the regulation of structural genes *FaCAD1* and *FaEGS2*. Our results indicate that the mutual interaction between *FaEOBII* and *FaDOF2* constitutes a transcriptional regulatory loop that would determine a fine-tuning of the expression of two key genes (*FaCAD1*, *FaEGS2*) that are responsible for eugenol production.

***FaDOF2* expression is ripening-related and hormonally regulated**

The expression pattern of the *FaDOF2*, *FaEOBII* and *FaEGS2* genes was ripening-related and mainly confined to fruit receptacles, where high levels of expression for the three genes were observed (Figure 8A; Figure S5) (Medina-Puche et al., 2015). A high expression level in flower was observed, where expression was restricted to petals (Figure S6). However, expression in vegetative tissues, such as roots and leaves, was lower (Figure 8C). This expression pattern was virtually identical to that of *FaEOBII* and *FaEGS2* (Medina-Puche et al., 2015) as well as other ripening-related genes that have been previously characterized as being physiologically involved in many metabolic processes that are responsible for the organoleptic properties of the strawberry fruit (Medina-Escobar et al., 1997; Moyano et al., 1998; Trainotti et al., 1999; Benítez-Burraco et al., 2003; Blanco-Portales et al., 2002, 2004; Raab et al., 2006; Griesser et al., 2008; Cumplido-Laso et al., 2012; Molina-Hidalgo et al., 2013; Medina-Puche et al., 2014; Molina-Hidalgo et al., 2015). This parallel expression pattern was also observed in genes that have been functionally characterized as being related with eugenol production in ripe fruit receptacles (*FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2*) (Aragüez et al., 2013; Medina-Puche et al. 2015). These results, together with those from transcriptomic and metabolomic studies, indicate that *FaDOF2* may be involved in eugenol production regulation through transactivation of *FaEGS2* (Figure 6), a structural gene encoding a key enzyme of the eugenol biosynthesis, in at least ripe fruit receptacles and petals. Involvement of *DOF* genes in phenylpropanoid metabolism regulation has been previously reported. For instance, in *Arabidopsis* cultured cells, over-expression of a set of *DOF* genes originated changes in the metabolomic and the transcriptomic profiles that identified *DOF* genes which were putatively involved in regulation of phenylpropanoid enzymes and flavonoid genes (Tsujiimoto-Inui et al., 2009). On the other hand, also in *Arabidopsis thaliana*, *AtDOF4;2* behaves as an activator or a repressor of

structural genes corresponding to phenylpropanoid metabolism, in an environmental and tissue-specific manner (Skircyk et al., 2007). MaDof23 has recently been reported as a transcriptional repressor and regulator of fruit ripening in banana, acting over genes associated with cell wall and aroma formation (Feng et al., 2016).

Literature widely describes that auxins and abscisic acid are the two main hormones that control strawberry fruit receptacle development and ripening processes, whilst the balance between both hormones determines the trigger towards maturation and associated inherent physiological changes (Perkins-Veazie et al., 1995; Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Medina-Puche et al., 2014). This dual regulation has also been observed for other genes whose expression is also up-regulated throughout the strawberry fruit ripening process (Cumplido-Laso et al., 2012; Daminato et al., 2013; Molina-Hidalgo et al., 2013; Molina-Hidalgo et al., 2015), including different ripening-related TFs previously characterized, such as *FaMYB10* (Medina-Puche et al., 2014) and *FaEOBII* (Medina-Puche et al., 2015). All these studies molecularly support previous proposals (Perkins-Veazie, 1995; Chai et al. 2011; Jia et al. 2011; Medina-Puche et al. 2014; Li et al. 2015), which indicate that ABA is the hormone that determines the transition between fruit development and ripening. As with other strawberry ripening-related genes, *FaDOF2* expression is antagonistically regulated by auxins and ABA. When ABA content in ripe receptacle was diminished, a decrease in *FaDOF2* expression was observed. On the contrary, when the ABA content was increased, a concomitant increment of *FaDOF2* expression was observed (Figure 9A-C). The decline in the inner contents of auxins in green unripe receptacles gave rise to an increase of *FaDOF2* expression (Figure 9D). The parallelism between spatio-temporal expression patterns and hormonal *FaDOF2* and *FaEOBII* regulation strengthens the relationship between the two FTs driving eugenol biosynthesis regulation.

Conclusion

In ripe strawberry receptacles, eugenol production requires involvement of three FTs

Our results indicate that a regulatory network that requires interaction between three transcription factors, two R2R3 MYB TFs (*FaMYB10* and *FaEOBII*) and a DOF TF (*FaDOF2*), are involved in eugenol biosynthesis regulation. *FaMYB10*, described as a master regulatory gene, would positively regulate *FaEOBII* expression, which in turn acts in a coordinated manner with *FaDOF2* in regulating eugenol production through control of the *FaEGS2* expression. Thus, our findings provide new insights into the transcriptional regulatory network of strawberry fruit ripening.

References

- Aharoni A, De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP** (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J* **28**: 319-332
- Aragüez I, Osorio S, Hoffmann T, Rambla JL, Medina-Escobar N, Granel A, Miguel Ángel Botella MA, Schwab W, Valpuesta V** (2013) Eugenol production in achenes and receptacles of strawberry fruits is catalyzed by synthases exhibiting distinct kinetics. *Plant Physiol* **163**: 946-958
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* **1**: 289-300
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero J-L, Muñoz-Blanco J** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Chandler) pectatelyase genes. *J Exp Bot* **54**: 633-645
- Blanco-Portales R, López-Raéz JA, Bellido ML, Moyano E, Dorado G, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (2004) A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Mol Biol* **55**: 763-780
- Blanco-Portales R, Medina-Escobar N, López-Raéz JA, González-Reyes JA, Villalba JM, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Chandler). *J Exp Bot* **53**: 1723-1734
- Boccaccini A, Santopolo S, Capauto D, Lorrari R, Minutello E, Belcram K, Palauqui JC, Costantino P, Vittorioso P** (2014) Independent and interactive effects of DOF affecting germination 1 (DAG1) and the DELLA proteins GA insensitive (GAI) and Repressor of ga1-3 (RGA) in embryo development and seed germination. *BMC Plant Biol* **14**: 200
- Bustamante CA, Civello PM, Martínez GA** (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 Sci* **177**: 49-56
- Cai X, Zhang Y, Zhang C, Zhang T, Hu T, Ye J, Zhang J, Wang T, Li H, Ye Z** (2013) Genome-wide analysis of plant-specific DOF transcription factor family in tomato. *J Integr Plant Biol* **55**: 552-566
- Chai Y-m, Jia H-f, Li C-l, Dong Q-h, Shen Y-y** (2011) *FaPYRI* is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* **62**: 5079-5089
- Cherian S, Figueroa CR, Nair H** (2014) 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *J Exp Bot* **65**: 4705-4722
- Cominelli E, Galbiati M, Albertini A, Fornara F, Conti L, Coupland G, Tonelli C** (2011) DOF-binding sites additively contribute to guard cell-specificity of AtMYB60 promoter. *BMC Plant Biol* **11**: 162
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, Hoffmann T, Sinz Q, Ring L, Studart-Wittkowski C, Luis Caballero J, Schwab W, Muñoz-Blanco J, et al** (2012) The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *J Exp Bot* **63**: 4275-4290

- Daminato M, Guzzo F, Casadoro G** (2013) A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *J Exp Bot* **64**: 3775-3786
- Díaz I, Vicente-Carbajosa J, Abraham Z, Martínez M, Isabel-Lamonedá I, Carbonero P** (2002) The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *Plant J* **29**: 453-464
- Díaz I, Martínez M, Isabel-LaMoneda I, Rubio-Somoza I, Carbonero P** (2005) The DOF protein, SAD, interacts with GAMYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development. *Plant J* **42**: 652-662
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2002) Predicting subcellular localization of proteins based on their n-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016
- Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz F, de los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (2009) Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria × ananassa*) FaWRKY1 and *Arabidopsis* AtWRKY75 proteins in resistance. *J Exp Bot* **60**: 3043-3065
- Feng BH, Han YC, Xiao YY, Kuang JF, Fan ZQ, Chen JY, LuWJ** (2016) The banana fruit DoF transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/erw032
- Folter S, ImminkRG, Kieffer M, Parenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, et al** (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424-1433
- Fornara F, de Montaigu A, Sánchez-Villarreal A, Takahashi Y, Ver Loren van Themaat E, Huettel B, Davis SJ, Coupland G** (2015) The GI-CDF module of *Arabidopsis* affects freezing tolerance and growth as well as flowering. *Plant J* **85**: 695-706
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R** (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 2367-2372
- Gaur VS, Singh US, Kumar A** (2011) Transcriptional profiling and in silico analysis of DoF transcription factor gene family for understanding their regulation during seed development of rice *Oryza sativa* L. *Mol Biol Rep* **38**: 2827-2848
- Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pérez-Pérez J, Oliveros JC, Lorenzo O, Solano R** (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant J* **66**: 700-711
- González-Calle V, Iglesias-Fernández R, Carbonero P, Barrero-Sicilia C** (2014) The BdGAMYB protein from *Brachypodium distachyon* interacts with BdDOF24 and regulates transcription of the BdCathB gene upon seed germination. *Planta* **240**: 539-552
- Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Muñoz-Blanco J, Schwab W** (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria × ananassa*) achene and receptacle. *J Exp Bot* **59**: 2611-2625

- Gupta, S. Malviya, N. Kushwaha, H. Nasim, J. Bisht, N. C. Singh, V. K. Yadav, D.** (2015) Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta* **241**: 549-562
- Hernando-Amado S, González-Calle V, Carbonero P, Barrero-Sicilia C** (2012) The family of DOF transcription factors in *Brachypodium distachyon*: phylogenetic comparison with rice and barley DOFs and expression profiling. *BMC Plant Biol* **12**: 202
- Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J* **48**: 818-826
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- 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 Physiol* **157**: 188-199
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195
- Koeduka T, Fridman E, Gang DR, Vassão DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP, et al** (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10128–10133
- Konishi M, Donner TJ, Scarpella E, Yanagisawa S** (2015) MONOPTEROS directly activates the auxin-inducible promoter of the Dof5.8 transcription factor gene in *Arabidopsis thaliana* leaf provascular cells. *J Exp Bot* **66**: 283291
- Konishi M, Yanagisawa S** (2007) Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Bioch* **45**: 623–629
- Konishi M, Yanagisawa S** (2015) Transcriptional repression caused by Dof5.8 is involved in proper vein network formation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Plant Res* **128**: 643–652
- Krebs J, Mueller-Roeber B, Ruzicic S** (2010) A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in DOF transcription factors. *J Plant Physiol* **167**: 583-586
- Kushwaha H, Gupta S, Singh VK, Rastogi S, Yadav D** (2011) Genome wide identification of DOF transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep* **38**: 5037-5053
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* **9**: 963-967
- Le Hir R, Bellini C** (2013) The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **4**: 164
- Li D, Li L, Luo Z, Mou W, Mao L, Ying T** (2016) Comparative transcriptome analysis reveals the influence of abscisic acid on the metabolism of pigments, ascorbic acid and folic acid during strawberry fruit ripening. *PLoS ONE* **10**: e0130037. doi:10.1371/journal.pone.0130037
- Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2003) Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* DOF gene families. *BMC Evol Biol* **3**: 17

- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC** (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol* **10**: 50
- Lucas-Reina E, Romero-Campero FJ, Romero JM, Valverde F** (2015) An evolutionarily conserved DOF-CONSTANS module controls plant photoperiodic signaling. *Plant Physiol* **168**: 561-574
- Ma J, Li MY, Wang F, Tang J, Xiong AS** (2015) Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in *Chinese cabbage*. *BMC Genomics* **31**: 16-33
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectatelyase from higher plants. *Plant Mol Biol* **34**: 867-877
- Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F, Hoffmann T, Ring L, Rodríguez-Franco A, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2014) MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *J Exp Bot* **65**: 401-417
- Medina-Puche L, Molina-Hidalgo FJ, Boersma M, Schuurink RC, López-Vidriero I, Solano R, Franco-Zorrilla JM, Caballero JL, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J** (2015) An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles. *Plant Physiol* **68**: 598-614
- Merchant C, Vallarino JG, Osorio S, Aragüez I, Villarreal N, Ariza MT, Martínez GA, Medina-Escobar N, Civello MP, Fernie AR, et al** (2013) Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *J Exp Bot* **64**: 4421-4439
- Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Luis Caballero J, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2013) The strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonatelyase 1 (*FaRGLyase1*) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J Exp Bot* **64**: 1471-1483
- Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Gelis S, Ramos J, Sabir F, Soveral G, Prista C, Iglesias-Fernández R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, et al** (2015) Functional characterization of *FaNIP1;1* gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Sci* **238**: 198-211
- Moreno-Risueño MA, Martínez M, Vicente-Carbajosa J, Carbonero P** (2007) The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Mol Genet Genomics* **277**: 379-390
- Moyano E, Portero-Robles I, Medina-Escobar N, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (1998) A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol* **117**: 711-716
- Negi J, Moriwaki K, Konishi M, Yokoyama R, Nakano T, Kusumi K, Hashimoto-Sugimoto M, Schroeder JI, Nishitani K, Yanagisawa S, Iba K** (2015) A Dof transcription factor, SCAP1, is essential for the development of functional stomata in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **23**: 479-484
- Noguero M, Atif RM, Ochatt S, Thompson RD** (2013) The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Sci* **209**: 32-45
- Pedersen S, Amtssygehus A** (2001) Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the iCycler iQ™ detection system. *BioRadiations(BioRad)* **107**: 10-11

- Perkins-Veazie P** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hort Rev* **17**: 267-297
- Raab T, López-Ráez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Muñoz-Blanco J** (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enoneoxidoreductase. *Plant Cell* **18**: 1023-1037
- Rubio-Somoza I, Martínez M, Abraham Z, Díaz I, Carbonero P** (2006) Ternary complex formation between HvMYBS3 and other factors involved in transcriptional control in barley seeds. *Plant J* **47**: 269-281
- Rueda-López M, Crespillo R, Cánovas F, Ávila C** (2008) Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. *Plant J* **56**: 73-85
- Rueda-López M, Cañas RA, Canales J, Cánovas FM, Ávila C** (2015) The overexpression of the pine transcription factor *PpDof5* in *Arabidopsis* leads to increased lignin content and affects carbon and nitrogen metabolism. *Physiol Plant* **155**: 369-383
- Rueda-Romero P, Barrero-Sicilia C, Gómez-Cadenas A, Carbonero P, Oñate-Sánchez L** (2012) *Arabidopsis thaliana* DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J Exp Bot* **63**: 1937-1949
- Santopolo S, Boccaccini A, Lorrai R, Ruta V, Capauto D, Minutello E, Serino G, Costantino P, Vittorioso P** (2015) DOF AFFECTING GERMINATION 2 is a positive regulator of light-mediated seed germination and is repressed by DOF AFFECTING GERMINATION 1. *BMC Plant Biol.* **15**: 72
- Sasaki N, Matsumaru M, Odaira S, Nakata A, Nakata K, Nakayama I, Yamaguchi K, Nyunoya H** (2015) Transient expression of tobacco BBF1-related Dof proteins, BBF2 and BBF3, upregulates genes involved in virus resistance and pathogen defense. *Physiol Mol Plant Path* **89**: 70–77
- Schaart JG, Dubos C, Romero De La Fuente I, van Houwelingen AM, de Vos RC, Jonker HH, Xu W, Routaboul JM, Lepiniec L, Bovy AG.** (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol* **197**: 454-467
- Schuurink RC, Haring MA, Clark DG** (2006) Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends Plant Sci* **11**: 20-25
- Seymour GB, Chapman NH, Chew BL, Rose JKC.** (2013) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnol J* **11**: 269-278
- Shaw LM, McIntyre CL, Gresshoff PM, Xue G-P** (2009) Members of the DOF transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Funct Integr Genomics* **9**: 485-498
- Shigyo M, Tabei N, Yoneyama T, Yanagisawa S** (2007) Evolutionary processes during the formation of the plant-specific DOF transcription factor family. *Plant Cell Physiol* **48**: 179-185
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton J-M, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Rojas JJR, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troggio M, Viola R, Ashman T-L, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J,**

- Girona EL, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet* **43**: 109-116
- Shimofurutani N, Kisu Y, Suzuki M, Esaka M.** (1998) Functional analyses of the Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain, in a pumpkin DNA-binding protein AOBP. *FEBS Lett* **430**: 251-256
- Skircyz A, Jozefczuk S, Stobiecki M, Muth D, Zanor MI, Witt I, and Mueller-Roeber B** (2007) Transcription factor AtDOF 4;2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis*. *New Phytol* **175**: 425-438
- Spitzer-Rimon B, Farhi M, Albo B, Cna'ani A, Ben Zvi MM, Masci T, Edelbaum O, Yu Y, Shklarman E, Ovadis M, et al** (2012) The R2R3-MYB-like regulatory factor EOB1, acting downstream of EOB2, regulates scent production by activating ODO1 and structural scent-related genes in petunia. *Plant Cell* **24**: 5089-5105
- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N-K, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A** (2010) EOB2, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *Plant Cell* **22**: 1961-1976
- Sun JH, Luo JJ, Tian L, Li CL, Xing Y, ShenYY** (2013) New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening. *J Plant Growth Regul* **32**: 461-470
- Symons GM, Chua YJ, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot* **63**: 4741-4750
- 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? *J Exp Bot* **56**: 2037-2046
- Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G** (1999) A novel E-type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol Biol* **40**: 323-332
- Tsujimoto-Inui Y, Naito Y, Sakurai N, Suzuki H, Sasaki R, Takahashi H, Ohtsuki N, Nakano T, Yanagisawa S, Shibata D, et al** (2009) Functional genomics of the DOF transcription factor family genes in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotech* **26**: 15-28
- Umemura Y, Ishiduka T, Yamamoto R, Esaka M** (2004) The DOF domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *Plant J* **37**: 741-749
- Van Moerkercke A, Haring MA, Schuurink RC** (2011) The transcription factor EMISSION OF BENZENOIDES II activates the MYB ODORANT1 promoter at a MYB binding site specific for fragrant petunias. *Plant J* **67**: 917-928
- Venkatesh J, Park SW** (2015) Genome-wide analysis and expression profiling of DNA-binding with one zinc finger (Dof) transcription factor family in potato. *Plant Physiol Bioch* **94**: 73-85
- Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC** (2005) ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* **17**: 1612-1624

Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Montenegro-Montero A, Drewe P, Najafabadi HS, Lambert SA, Mann I, Cook K et al (2014) Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell* **158**: 1431-1443

Woodward JR (1972) Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J Sci Food Agr* **23**: 465-473

Yanagisawa S (2004) DOF domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol* **45**: 386-391

Yanagisawa S (2002) The DOF family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **7**: 555-560

CHAPTER 4

***FaBOP1* encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that regulates the ripening acting as co-activator by controlling the transcriptional regulation**

Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Tohge T, Caballero JL, Rodríguez-Franco A, Fernie AR, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J. 2016. *FaBOP1* encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that regulates the ripening acting as co-activator by controlling the transcriptional regulation.

Footnote:

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaBOP1*.

CHAPTER 4***FaBOP1* encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that regulates the ripening acting as co-activator by controlling the transcriptional regulation****Abstract**

Ripening in strawberry fruit is a complex process which carries out several changes in flavor, color taste and softening. The regulatory network that supports these molecular and metabolic changes that occur along the ripening has been scarcely studied. High-throughput transcriptomic analyses allowed us to identify a ripening induced gene whose expression was quite fruit specific and hormonally regulated, in an antagonist way, by auxins and ABA. The sequence of the cDNA corresponding to this gene presented high homology with those of genes that encode BTB-ankyrins proteins of BLADE-ON-PETIOLE (BOP) class. BTB-ankyrin proteins are plant-specific transcriptional co-activators. The *FaBOP1* expression was silenced in ripe strawberry receptacles. As phenotypic effect of gene silencing, we observed a lack of colour, compared with the control receptacles. The flavonoid/phenylpropanoid pathway structural genes were down-regulated in transgenic *FaBOP1* silenced fruits. This was corroborated by metabolite comparison between both control and transgenic fruits. By using the yeast two-hybrid system, we have demonstrated that FaBOP1 interacts with FaMYB10, a master R2R3 MYB transcription factor regulating both early and late biosynthetic genes from the flavonoid/phenylpropanoid pathway. Our study has revealed the role for the BOP-like coactivator FaBOP1, which bind to the transcription factor R2R3-MYB10 and in this way, to regulate the F/P biosynthesis. The dramatic effect in the phenotype and metabolic profile by the transient silencing clearly shows the importance of the role played, as a co-activator, by FaBOP1 in strawberry fruit receptacle. Thus, the most important molecular and metabolic changes associated with ripening, are affected by *FaBOP1* silencing.

Introduction

Ripening in strawberry fruit is a complex process which carries out several changes in flavor, color taste and softening. The molecular basis of these changes are partially established, and it has been identified genes that code for enzymes related with the production of flavor as alcohol acyl transferases (Pérez et al., 1996; Aharoni et al., 2000; Cumplido-Laso et al., 2012), eugenol production (Aragüez et al., 2013), quinone oxidoreductase (Raab et al., 2006); colour enzymes as phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Pombo et al., 2011), cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) (Almeida et al., 2007), chalcone synthase (CHS) (Hoffmann et al., 2006), dihydroflavonol reductase (DFR) (Moyano et al., 1998), O-methyltransferase (OMT) (Lunkenbein et al., 2006), flavonoid 3-hydroxylase (F3H) and chalcone reductase (CHR) (Manning, 1998), anthocyanidin synthase (ANS) anthocyanidin reductase (ANR) leucoanthocyanidin reductase (LAR) (Salvatierra et al., 2013); and softening enzymes as pectate lyase (PL) (Jimenez-Bermudez et al., 2002), polygalacturonase (PG) (Quesada et al., 2009), rhamnogalacturonate lyase (RGL) (Molina-Hidalgo et al., 2013).

Strawberry fruit has been classified as non-climacteric, since there is no concomitant burst of respiration and ethylene production that triggers to the ripening process. It is the ratio abscisic acid ABA/auxins what determines the transition between fruit development and ripening (Perkins-Veazie, 1995; Li et al., 2015). However, at present, the regulatory network that supports these molecular and metabolic changes that occur along the ripening has been scarcely studied. In this sense, few transcription factors have been functionally characterized. The silencing of *FaMADS9*, a MADS-box TF, triggers a decrease in the amount of anthocyanins (Seymour et al., 2011). *FaEOBII* regulates the eugenol production in ripe strawberry fruits (Medina-Puche et al., 2015). *FaGAMYB* plays a role at the beginning of ripening also regulating the production of color (Vallarino et al., 2015). *FaMYB9/FaMYB11*, *FaBHLH3* and *FaTTG1* works as a complex in controlling the proanthocyanidin biosynthesis. (Schaart et al., 2013). *FaTCP11* and *FaSCL8* regulate specific nodes in the flavonoid pathway (Pillet et al., 2015). Both *FaMYB1* and *FaMYB10* control the flavonoid/phenylpropanoid metabolism (Aharoni et al., 2001; Medina-Puche et al., 2014). *FaMYB10* is strongly induced during ripen stages and has a key central role by regulating most of the biosynthetic genes related to the F/P pathway that are connected to ripening. In fact, *FaMYB10* gene silencing expression in ripen strawberry receptacles give rise to a white phenotype in ripen fruits (Medina-Puche et al., 2014). Additionally, *FaMYB10* also regulated the expression of *GST* and *MATE* genes, two putative anthocyanins vacuole transporter (Medina-Puche et al., 2016).

High-throughput transcriptomic analyses performed in our research group allowed us to identify a ripening induced gene whose expression was quite fruit specific and hormonally regulated, in an antagonist way, by auxins and ABA (Medina-Puche et al., 2016). The sequence of the cDNA corresponding to this gene presented high homology with those of genes that encode BTB-ankyrins proteins of BLADE-ON-PETIOLE (BOP) class.

BTB-ankryin proteins are plant-specific transcriptional co-activators. They are so called because of two conserved protein-protein interaction motifs: a BTB/POZ (for Broad Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/POX virus and Zinc finger) domain at the N-terminus and four ankryin motifs near the C-terminus. The *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) genome encodes six BTB-ankryin proteins with functions in development and defense: NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1), NPR2, NPR3, NPR4, BOP1 (BLADE-ON-PETIOLE1) and BOP2 (Khan et al., 2014).

The *BLADE-ON-PETIOLE* (*BOP*) genes in *Arabidopsis* belong to the *NPR1* family (for nonexpressor of *PR1*), whose members play essential roles in systemic acquired resistance. It has been shown that AtBOP1 and AtBOP2 function redundantly to regulate leaf and flower patterning (Ha et al., 2003; Ha et al., 2004; Hepworth et al., 2005; Norberg et al., 2005). Additionally, several studies demonstrated that *BOP1* and *BOP2* genes were essential for floral organ abscission (Hepworth et al., 2005; Wu et al., 2012).

The ankyrin repeat proteins, consisting of a 33-amino acid ankyrin domain repeated in tandem. Ankyrin repeats function as transcriptional regulators. In plants, ankyrin repeat proteins are involved in defense signaling as well as in developmental processes (Nodzon et al., 2004; Yang et al., 2012). One major function of these motifs is to mediate protein-protein interaction. The additional protein motifs in ankyrin repeat containing proteins are important for determining their functions in plants. In *Arabidopsis*, PIA2, a phytochrome-interacting ankyrin repeat-containing protein, localized in the cytoplasm and nucleus, mediates the interactions between phytochrome A and partner proteins to regulate the gene expression of anthocyanin biosynthetic enzyme and control phytochrome-mediated anthocyanin accumulation in plants (Yoo et al., 2011).

The aim of the present study was to provide new information on the regulation of the anthocyanin biosynthesis in *Fragaria × ananassa* fruit receptacles by analyzing the silencing of the expression of *FaBOP1*, to determine its regulatory role of the F/P pathway that renders anthocyanins in the ripen stages of strawberry receptacle.

Results

Structural features of the amino acid deduced sequence of *FaBOP1* gene

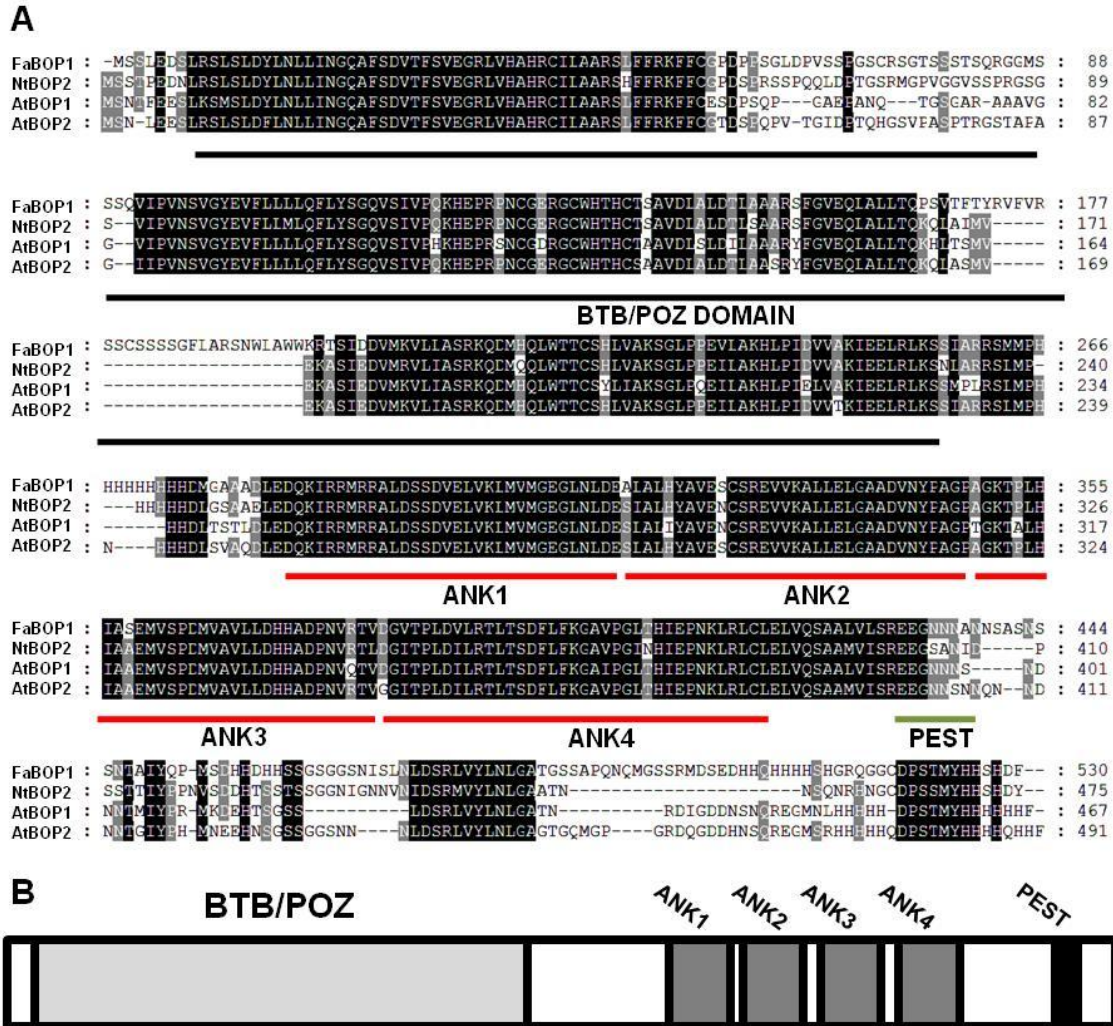
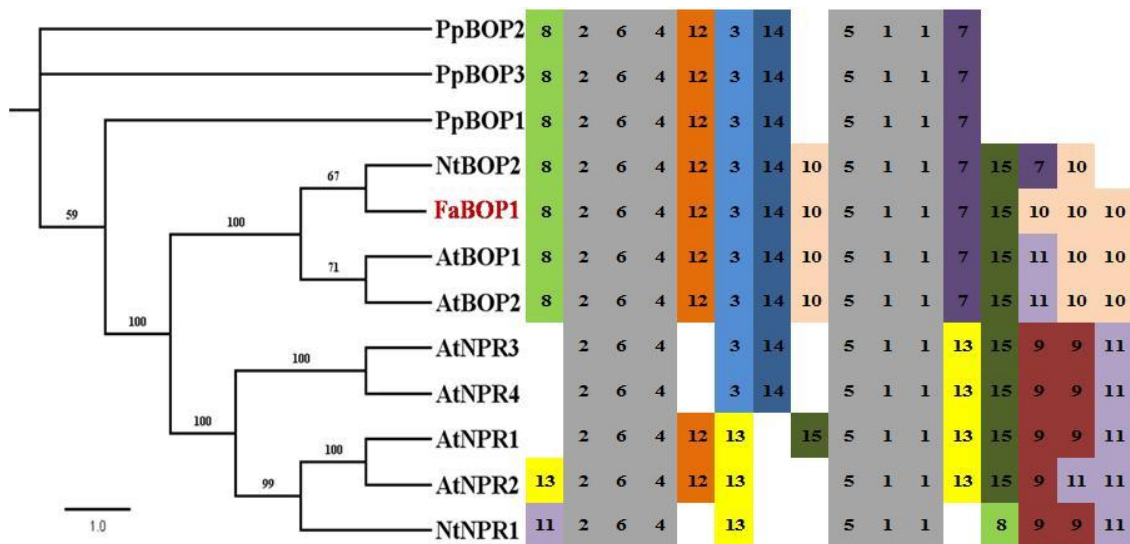


Figure 1. (A) Alignment of the predicted amino acid sequence of FaBOP1 with NtBOP2, AtBOP1 and AtBOP2 proteins. The BTB/POZ domain and ankyrin repeats are marked. Amino acids in black shading indicate identical amino acids among the proteins. (B) Conserved domains in the FaBOP1 protein. The light gray box represents the BTB/POZ domain. Dark gray boxes show ankyrin-repeats (ANK). The black box indicates the PEST sequence enriched in Pro (P), Glu (E), Ser (S), and Thr (T). The PEST-rich region was identified using the program ePESTfind (<http://expasy.org/tools/>).

A high-throughput microarray comparison between the transcriptomes from green immature versus red-ripened strawberry fruit receptacles (Medina-Puche et al. 2016) enabled us to identify a putative gene (GENE21905) whose expression was strongly up-regulated in ripen receptacles. BLASTP search showed a high degree of similarity between the deduced protein sequence of GENE21905 and BOP proteins from higher plants. For this reason we have named to this gene as FaBOP1 (Figure 1). The cDNA sequence of FaBOP1 gene contains an open reading frame of 1593 bp that potentially encodes a polypeptide of 530 amino acids with a

predicted molecular mass of 57.99 kDa. This molecular weight and isoelectric point for FaBOP1 deduced protein was similar to those found for NtBOP2, AtBOP1 and AtBOP2 proteins. Besides, a similar prediction for its subcellular localization was observed for these four BOP proteins (Table S3).



Motif	E-value	Consensus sequences
1	9.0e-196	[LR][NG][LP][DR][GE][AY]T[APV]LH[Y]A[AV][EM]RC[SDE][PR][KE][VM][VI][AK]rLL[DE][LHK][GH]A
2	1.6e-114	R[LEH]V[HS][AV]HRC[IV]L[AS]ARS[PL]FF[FK]K[FL]FCGD[KD]Q
3	2.2e-143	EK[AT][SL][IV]E[DN]V[ML][RKP][VM]L[IL][AV][AS][RF]K[QC]D[ML][HT][QH]L[WL][TD][TLQ]C[SI][HK]
4	8.8e-120	C[G]V[DE]R[GS]CWH[TV][HA]C[RST][SPA]AVD[FL][AG][LV][DE][TLV][LM][YA]A[AS][FR][FV]F[GQ]
5	6.9e-110	[KL][EL][DE]Q[KH][ITV][KR]R[M]I[RQ][KR]ALDS[SD]DVELVKL[ML][VL]M[EG]E[GH]
6	5.0e-104	QPKx[QS]L[KP]E[V]IIPV[GNY][SE]VGY[DE][VA][FV][LMV]L[LV]L[QA][FY]LYSG[QR]V[SR][IP][FV]P[QK]
7	1.5e-062	DP[NH]V[RQ][TS][VA][DST]G[A]T[PA][LM]DI[LV][RQ][TS][LG][TA][SA][DE][FIV][LQ][FS][KA]G[AG][V]
8	2.4e-062	[DE]Q[SL][KR][ST]LS[LA]D[FY]LNL[LD][ID]NGQAFSDVTF SVE[GD]
9	3.7e-055	[ED][EDR][LH][LQR][MT]R[LM][LK][AY]L[EMS][KN][RT]V[EGA][LT][AG][KQR][RL][FL]FP[RT][EC][AS]
10	5.8e-035	[RP]S[L]T[M][PY]HHHHHH
11	5.8e-014	E[EK][DGE]TAE[EKS]R[LR][QL]K[KLR][MQ]RYMEL[KQ][ED][DT][LV][FKT]KA[FY]S[EKL]D
12	5.8e-013	EQL[AS][LT][LI]TQK[HQ]L[AT][SA]M[VA]
13	2.7e-007	[DE]I[FL][TK]L[DA][GN][RI][CST][AG][KLV][AN][IC]E[KR][LR]L[TD]R[CPA][KI][ED][IY][IH][TV]K[STP]I
14	5.3e-005	V[AE][KE][IL][EK][EQS][LI]R[LQ]KS[G S][IY]A
15	2.6e+001	LC[LI][ED][IL][LV][EQ][SR][AE][AJ][KLMR]

Figure 2. (A) Phylogenetic tree and schematic distribution of conserved motifs among the deduced sequences of the BTB/POZ domain proteins of the species used in this study. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates. The accession numbers of the proteins are as follows: AtBOP1 (At3g57130), AtBOP2 (At2g41370), PpBOP1 (EDQ77565), PpBOP2 (EDQ75924), PpBOP3 (EDQ51035), NtNPR1 (ABH04326.1), AtNPR1 (At1g64280), AtNPR2 (At4g26120), AtNPR3 (At5g45110), NtBOP2 (EF051131) and AtNPR4 (At4g19660). Bootstrapping values are indicated as percentages. (B) Sequences of conserved amino-acid motifs of the BTB/POZ domain proteins of the species used in this study. MEME; (Bailey et al., 2009).

Bioinformatic analysis of domains structures showed us the presence of a BTB/POZ domain (for Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac/POX virus and Zinc finger) at the N-terminus, as well as four ankyrin motifs located near the C-terminus of the FaBOP1 deduced protein. This

two conserved domain has been previously proposed as protein-protein interaction motifs (Khan et al., 2014). Additionally, FaBOP1 contains a PEST sequence (enriched with Pro, Glu, Ser, and Thr) implicated in protein degradation. That PEST sequence was also present in BOP proteins from *Arabidopsis thaliana* (Figure 1).

The phylogenetic tree comparing FaBOP1 with other BOP or BTB-ankyrin containing proteins (NPRs proteins) indicated that FaBOP1 was included into a separate subclade of BOP proteins that contains AtBOP1 and AtBOP2, as well as NtBOP2, as representative partners. The strongest homology was found with NtBOP2 protein from tobacco (Figure 2). According to the MEME analysis, motif 10, histidine-rich, is conserved only in this subgroup (Figure 2).

The *FaBOP1* expression is ripening-related, preferentially expressed in fruit receptacle and hormonally regulated.

qRT-PCR analysis shown that the amount of *FaBOP1* transcript in fruit receptacles was very low during the fruit developmental stages (G1, G3 and W). That was followed by a drastic increase of this amount along the ripening (R), overripe (OR) and senescence (SN) stages of ripening (Figure 3A). On the other hand, *FaBOP1* gene was weakly expressed in fruit achenes from all developmental and ripening stages studied as well as in different vegetative tissues as flowers, roots, runners or leaves (Figure 3B and C). This spatio-temporal expression pattern indicate that *FaBOP1* gene expression is quite fruit receptacle-specific and suggest that FaBOP1 protein plays, in fruit receptacle, an important physiological role related to its ripening process.

It is well known that auxins are biosynthesized in the achenes and released afterwards to the receptacles, fostering receptacle growth and development while preventing premature ripening. The elimination of the achenes from the surface of immature green fruit receptacle, decrease the internal auxins content and promote the expression of many ripening related genes (Molina-Hidalgo et al., 2013; Medina-Puche et al., 2014; Medina-Puche et al., 2015; Molina-Hidalgo et al., 2015). To determine if *FaBOP1* expression is negatively regulated by auxins we have analyzed the changes in the amount of *FaBOP1* transcripts comparing the levels of *FaBOP1* transcripts in both control and deached green fruits receptacles at the Green 3-stage that were externally treated with or without the auxin NAA. As in the case of other ripening-related genes, the amount of *FaBOP1* transcripts raised in deached G3-fruits (Figure 4A). This increase was partially prevented in deached fruits that were treated with NAA. These results showed that the content of auxins in the fruit receptacle negatively influence the expression of *FaBOP1* gene.

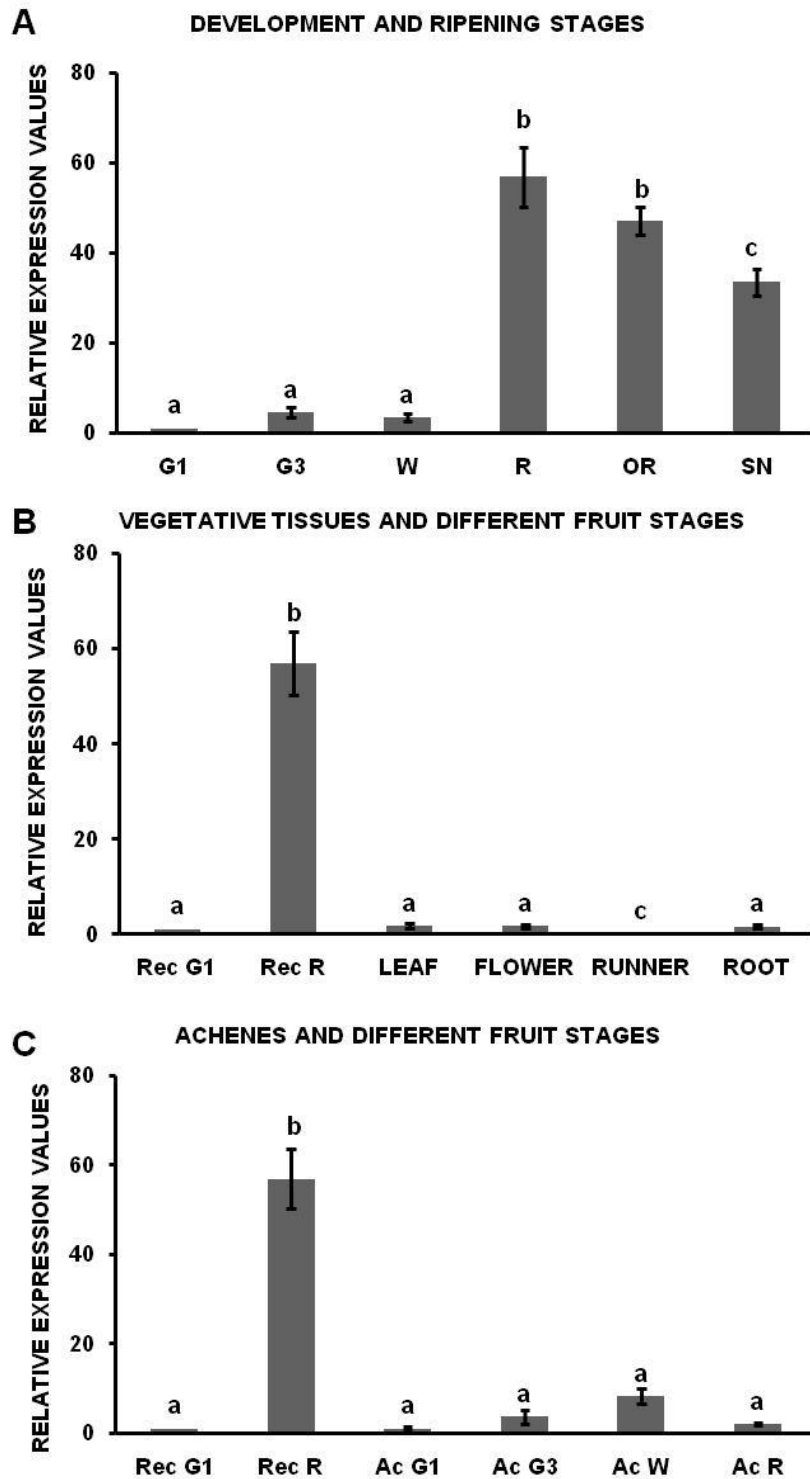


Figure 3. (A). Developmental expression of the strawberry *FaBOP1* in fruit receptacle. (B) Vegetative tissues vs green1 and red receptacles. (C) Achenes vs reen1 and red receptacles. of *F. × ananassa* cv. Camarosa variety. QRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaBOP1* gene. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SN: senescent stage; Rec G1: receptacle G1; Rec R: receptacle R. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

On the other hand, recent reports have demonstrated that the increase of internal ABA concentration in fruit-receptacle, can positively affect the anthocyanin production (Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Medina-Puche et al., 2014; Li et al., 2015). In regards to this fact, we have studied the influence of ABA on *FaBOP1* gene expression. To do this, we have analyzed the variation in the levels of transcript corresponding to *FaBOP1* in different physiological conditions where the internal content of ABA in fruit receptacle was decreased or increased (Medina-Puche et al., 2014). As was expected in ripening-related genes, a decrease in the endogenous ABA content led to a concomitant reduction of *FaBOP1* expression (Figure 4B and C), whilst in those physiological situations in which the endogenous ABA concentration was raised ((Medina-Puche et al., 2014; Medina-Puche et al., 2015)), also the amount of *FaBOP1* transcription increased. (Figure 4D).

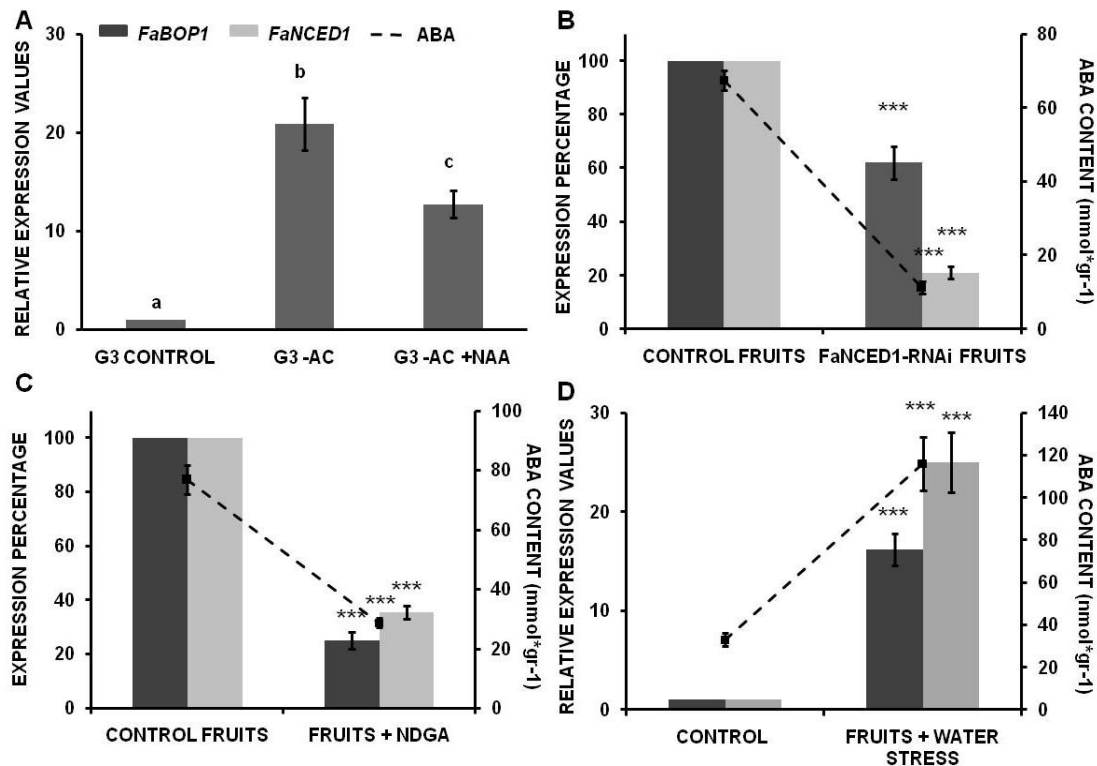


Figure 4. Analysis by qRT-PCR of *FaBOP1* and *FaNCED1* gene expression in (A) Analysis of the effects of removing achenes from G3 developing fruits and their treatment with auxins on *FaBOP1* gene expression by qRT-PCR. After auxin treatment, the increase in mRNA value was relative to G3 fruit (control), which was assigned an arbitrary value equal to unity. G3-Control: green fruit receptacle; G3-Deachenes: G3 fruit receptacle without achenes for 5 days; G3-Deachenes+NAA: G3 fruit receptacle without achenes plus NAA for 5 days (added at day zero). (B) G-W fruits agroinfiltrated with the *NCED1*-RNAi construct and (C) strawberry G-W fruits treated with NDGA (D) strawberry G-W fruits under water stress. The dashed line indicates the ABA content in analysed fruits. (B) Control fruit: strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; *NCED1*-RNAi fruits: transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with the *FaNCED1*-pFRN construct. (C) Control fruit: G-W fruit injected with H₂O; Fruit + NDGA: G-W fruits injected with NDGA (100 μM); both samples were harvested 8 days after beginning of treatment. (D) Control fruit: fruits with their pedicels immersed in MS medium with sucrose. *FaBOP1*

and *FaNCED1* gene expression were analysed in fruits, with their pedicels kept in the air. The cultivar used was *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. Statistical significance (A) by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test) and (B, C, D) with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (***) p -value < 0.001 .

Subcellular localization of the FaBOP1 protein

BOP proteins are considered as plant-specific transcriptional co-activators. Therefore, to determine the subcellular location of the FaBOP1 protein is crucial as far as this location could be a key control point for the action of FaBOP1 protein. By using several bioinformatics protein localization predictions tools, FaBOP1 was predicted to be localized into the nucleus with higher probability (Table S3). To confirm this bioinformatic prediction we have used a transient expression system based on the agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves, with a *35S::GFP:FaBOP1* construct that express FaBOP1 fused to green fluorescent protein. The results obtained indicated that, as in the case of other plant BOP protein (Hepworth et al., 2005; Jun et al., 2010; Saleh et al., 2011; Wu et al., 2012), FaBOP1 was localized in both nucleus and cytoplasm of the cells (Figure 5).

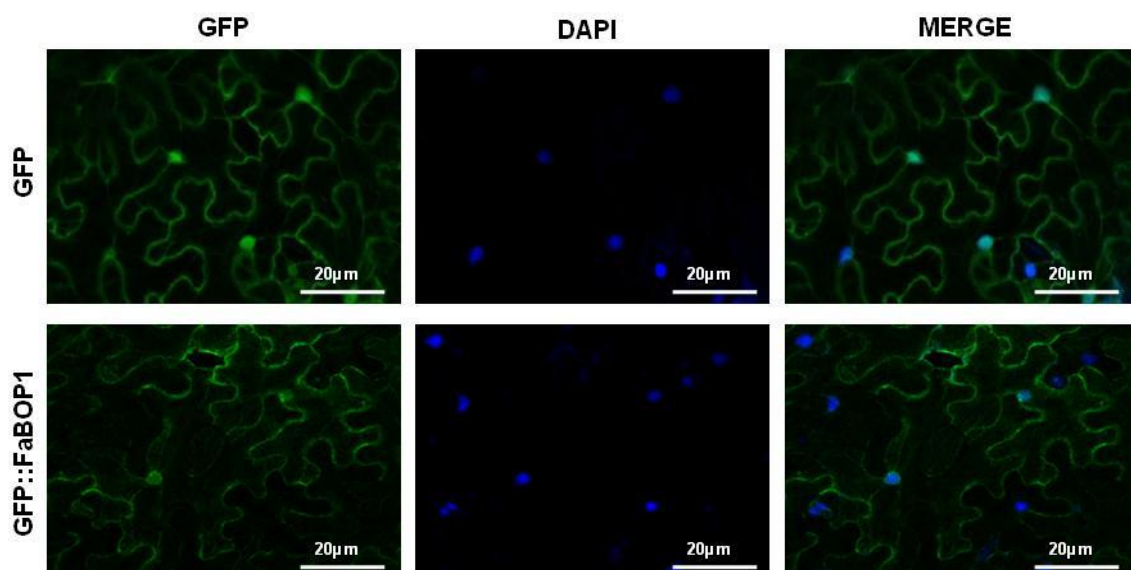


Figure 5. Subcellular localization of the FaBOP1 protein. The leaves of *Nicotiana benthamiana* were agroinfiltrated with translational constructs *35S::GFP:FaBOP1* and with *35S::GFP* as control. (A-C) Leaves infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid *35S::GFP*. (D-F) GFP fluorescence in *N. benthamiana* leaves infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid *35S::GFP::FaBOP1*. (C and F) Merged image of both agroinfiltrations. GFP: green fluorescent protein; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (nuclei dye); MERGE: merged view of the GFP and DAPI images.

FaBOP1 acts as co-regulator of the expression of ripening related genes related with the secondary metabolism

As far as FaBOP1 it is not a transcription factor, but could act as a co-activator of gene expression throughout the interaction with transcription factors (Khan et al., 2014), we performed genome-wide comparative transcriptomic analysis to elucidate the regulatory function that plays FaBOP1 along fruit ripening. For that we have done comparative transcriptome analysis between receptacles with the expression of *FaBOP1* gene transitory silenced *versus* control non-silenced receptacles (Figure 6A). As phenotypic effect of gene silencing, we observed a lack of colour, compared with the control receptacles (Figure 7).

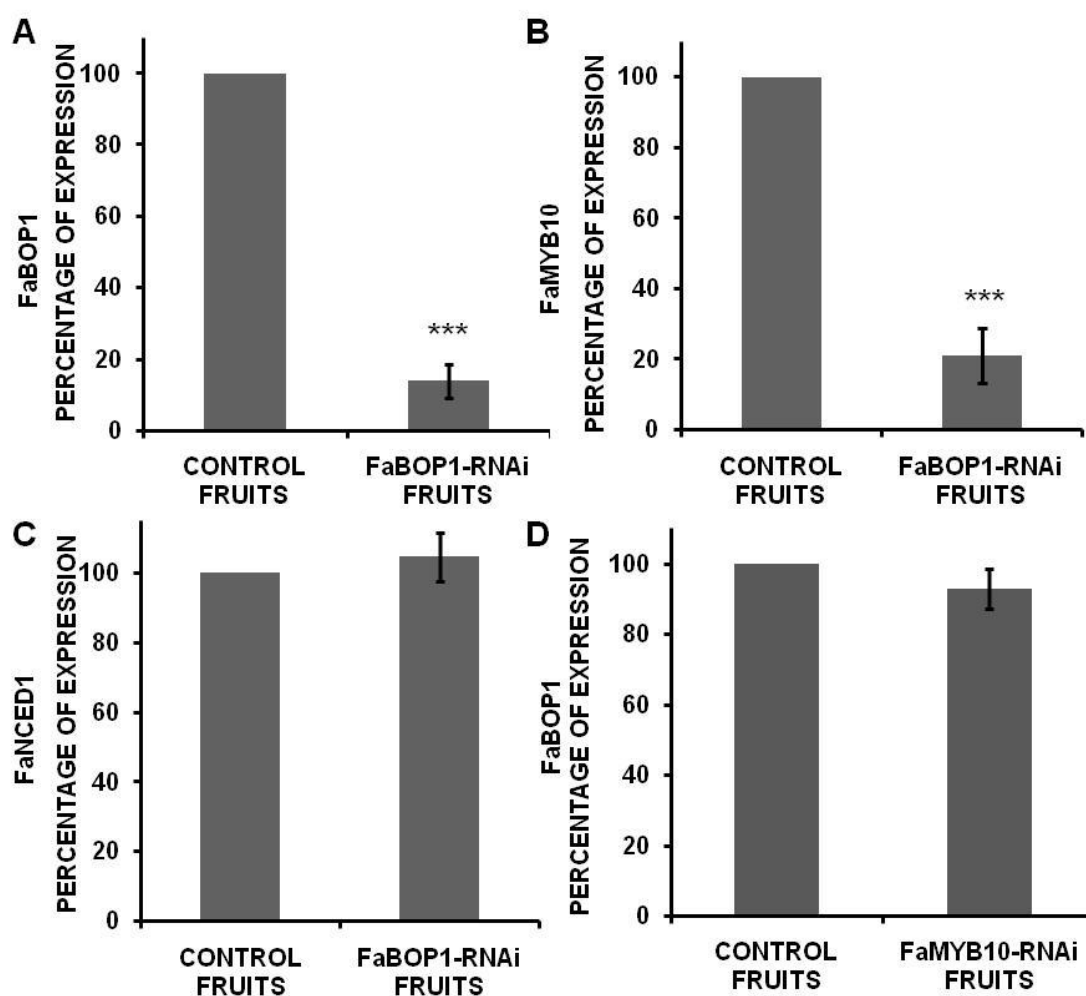


Figure 6. Analysis by qRT-PCR of (A) *FaBOP1*, (B) *FaMYB10* and (C) *FaNCED1* gene expression in transgenic *FaBOP1*-RNAi strawberry fruits (*F. × ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaBOP1* construct. (D) *FaBOP1* gene expression in transgenic *FaMYB10*-RNAi strawberry fruits (*F. × ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control fruit) and pFRN-*FaMYB10* construct. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (***) p-value < 0.001.

After the transcriptomic comparación, we only observed a significant down regulation of the amount of transcript corresponding to 124 genes in transiently *FaBOPI* silenced fruits. These transcriptional changes after silencing were classified attending to the gene function (Table S4). All of them were also induced in ripen fruits (Medina-Puche et al., 2016).

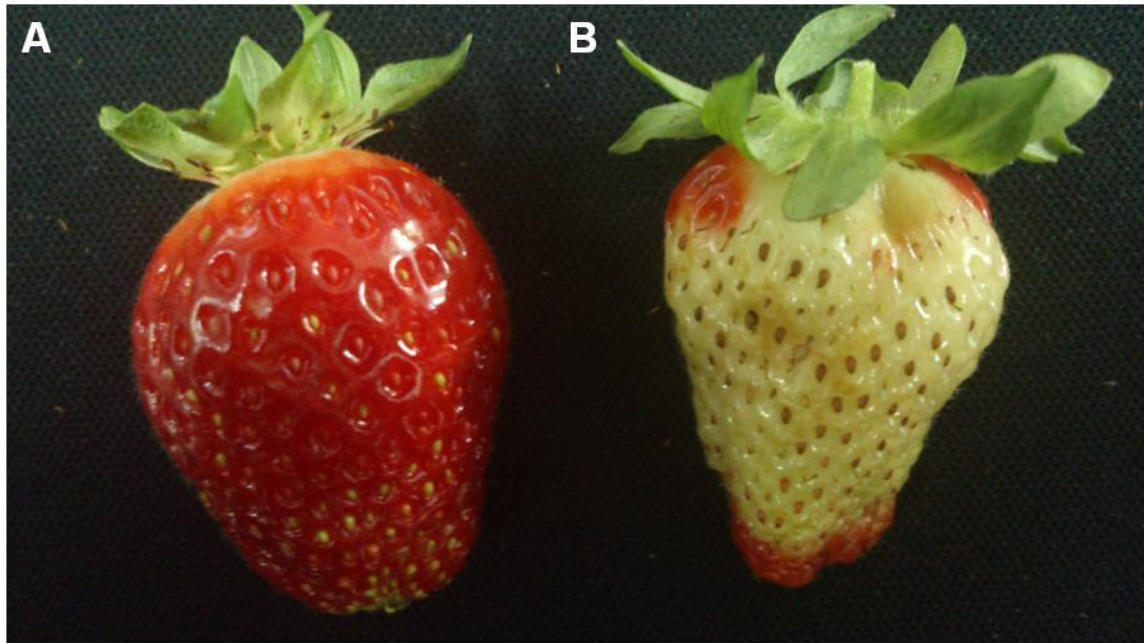


Figure 7. (A) Control fruit agroinfiltrated with the empty pFRN vector. (B) Strawberry transgenic fruits agroinfiltrated with *FaBOPI*-pFRN construct.

It is noteworthy that one of the genes whose expression was repressed in *FaBOPI* silenced receptacles was the *FaMYB10* (*GENE31413*) (Figure 6B), a R2-R3 MYB ripening-related transcription factor previously characterized as a major regulator of the flavonoid/phenylpropanoid metabolism (Medina-Puche et al., 2014), suggesting that this transcription factor acts downstream of *FaBOPI*. *FaNCE1* gene expression was measured in *FaBOPI*-RNAi fruits as control of the stage of the ripening (Figure 6C). Additionally, we tested the expression of *FaBOPI* in *FaMYB10*-RNAi fruits, ensuring that there is no reciprocal regulation of both genes (Figure 6D).

Consequently with the decrease of *FaMYB10*, the expression of genes corresponding to early and late biosynthetic enzymes of the flavonoids/phenylpropanoids pathway was down-regulated (Table 1). Similarly, the gene that codes a shikimate dehydrogenase (*GENE22235*) was also down-regulated (Table S4). This enzyme is responsible for the synthesis of precursors for the F/P pathway. The expression of all these previously mentioned genes was also repressed when the expression of *FaMYB10* was silenced in strawberry fruits (Medina-Puche et al., 2014). In addition to the flavonoid/phenylpropanoid pathway structural genes, the expression of genes

that potentially could be involved in the transport of flavonoids, such as those showing strong similarity with MATE transporters (*GENE04460*, *GENE07028*), was also down-regulated in transgenic *FaBOPI* silenced fruits (Table 1).

Table 1. Microarray data from transcriptomic comparison, corresponding to flavonols/phenylpropanoid metabolism and transporters groups, between transgenic transiently-silenced *FaBOPI* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2011).

GENE ID	FaBOPI-RNAi		Red vs Green receptacle		Best Match BLASTX	Species	E-value	accession number
	FOLD	P-VALUE	FOLD	P-VALUE				
FLAVONOLS/PHENYL PROPANOID METABOLISM								
gene09603	-16.711	8.73E-04	27.161	8.66E-05	4-Coumarate-CoA ligase 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.00E+00	NM_116755.4
gene04128	-15.608	5.14E-04	6.454	5.87E-04	Anthranilate synthase	<i>Populus trichocarpa</i>	2.00E-122	XM_002314725.1
gene20939	-160.055	1.35E-05	6.340	4.75E-04	Anthranilate synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.00E+00	M92353.1
gene32347	-40.223	9.30E-06	3.336	8.42E-04	Anthocyanidin synthase (FaANS)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AY695817.1
gene28093	-13.238	1.12E-03	5.436	2.56E-04	Cinnamate-4-hydroxylase	<i>Rubus occidentalis</i>	0.00E+00	FJ554629.1
gene15845	-5.855	1.95E-03	2.516	1.55E-03	Cinnamoyl CoA reductase 1 (CCR1)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AY285922.1
gene29483	-24.587	2.14E-03	6.188	2.65E-04	Cinnamoyl CoA reductase 2 (CCR2)	<i>Populus trichocarpa</i>	1.00E-158	XM_002314016.1
gene26826	-70.793	8.68E-04	2.914	5.07E-03	Chalcone synthase (FrCHS2)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AB201756.1
gene26825	-71.096	6.40E-04	2.926	4.43E-03	Chalcone synthase (FrCHS5)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AB201758.1
gene20698	-20.429	4.61E-02	10.549	1.21E-04	cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	2.00E-126	HQ268590.1
gene15176	-6.909	3.17E-03	2.021	4.84E-03	Dihydroflavonol -4-reductase	<i>Rosa hybrida</i>	1.00E-161	AY780885.1
gene30782	-22.301	5.25E-04	9.918	7.35E-04	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	<i>Medicago truncatula</i>	2.00E-109	XM_003609420.1
gene14611	-79.300	2.01E-04	2.749	1.13E-03	Flavanone 3-hydroxylase (FrF3H1)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AB201760.1
gene04262	-13.217	1.47E-02	4.199	7.82E-04	malonyl-CoA:isoflavone 7-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase	<i>Glycine max</i>	2.00E-92	NM_001249890
gene09753	-29.911	3.86E-04	4.987	3.24E-04	Phenylalanine ammonia-lyase 2	<i>Rubus idaeus</i>	0.00E+00	AF237955.1
gene23261	-4.686	8.07E-03	3.087	1.03E-03	Phenylalanine ammonia-lyase 6	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	HM641823.1
gene26265	-19.423	2.52E-04	5.822	2.99E-04	UDP-glucose glucosyltransferase (FaGT2)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AY663785.1
gene12591	-68.939	2.31E-04	170.167	7.29E-05	UDP-glucose glucosyltransferase 1(FaGT1)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.00E+00	AY663784.1
gene35028	-53.061	1.14E-05	4.040	8.29E-04	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	3.00E-165	XM_007051672.1
TRANSPORTERS								
gene04460	-16.788	6.39E-06	3.538	1.13E-03	Amino acid transporter	<i>Populus trichocarpa</i>	7.00E-171	XM_002323825.1
gene07028	-190.556	5.21E-07	106.577	7.73E-05	Multidrug and toxin extrusion protein (MATE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00E-160	NM_124290.2

The expression of a set of different genes, not flavonoids/phenylpropanoids-related, was also down-regulated in silenced *FaBOPI*-RNAi transgenic fruits. Between them, several transcription factors, such as, *WRKYs*, *MYBs* or *AP2/ERF*, were also down-regulated (Table 2). The relative mRNA levels of a few important genes related with cell wall metabolism were significantly down-regulated, such as those that potentially encode cell wall enzymes, in *FaBOPI*-RNAi fruits (Table 3).

Table 2. Microarray data from transcriptomic comparison, corresponding to transcription factor group, between transgenic transiently-silenced *FaBOPI* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2011).

GENE ID	FaBOPI-RNAi		Red vs Green receptacle		Best Match BLASTX	Species	E-value	accession number
	FOLD	P-VALUE	FOLD	P-VALUE				
TRANSCRIPTION FACTORS								
gene04916	-600.981	3.93E-09	8.949	1.71E-03	AP2/ERF domain-containing transcription factor	<i>Populus trichocarpa</i>	7e-37	XM_002327017.1
gene32084	-5.811	3.85E-04	4.438	8.45E-04	AP2/ERF domain-containing transcription factor (DREB14)	<i>Populus trichocarpa</i>	6.00E-63	XM_002304518.1
gene25544	-12.580	4.76E-07	4.558	4.08E-04	bZIP domain class transcription factor	<i>Malus x domestica</i>	0.00E+00	HM122472.1
gene25060	-13.970	5.43E-03	30.720	4.04E-04	MYB transcription factor 10	<i>Rosa rugosa</i>	6.00E-46	FR828543.1
gene31413	-226.048	4.69E-08	62.013	2.85E-04	R2R3 MYB transcription factor FaMYB10 (Medina-Puche et al., 2015)	<i>Fragaria x ananassa</i>	1.00E-41	EU155162
gene02643	-3.300	9.92E-03	7.061	3.79E-03	MYB transcription factor 161 (MYB161)	<i>Glycine max</i>	2.00E-87	DQ822965.1
gene28720	-19.888	1.08E-05	24.423	7.16E-05	WRKY transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>	5.00E-62	XM_003617375.1
gene03411	-4.755	2.51E-02	49.875	1.19E-04	WRKY transcription factor 6	<i>Vitis vinifera</i>	1.00E-76	XM_002269660.2

It is noteworthy that all of these classes are tightly functionally associated with ripening processes. Further, the expression of a set of genes, still functionally uncharacterized, was also down-regulated (Table S4). The expression of several of these genes identified as down-regulated in microarrays analyses was confirmed using real-time RT-PCR (Figure S2).

Table 3. Microarray data from transcriptomic comparison, corresponding to cell wall metabolism group, between transgenic transiently-silenced *FaBOP1* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2011).

GENE ID	FaBOP1-RNAi		Red vs Green receptacle		Best Match BLASTX	Species	E-value	accession number
	FOLD	P-VALUE	FOLD	P-VALUE				
CELL WALL METABOLISM								
gene22145	-9.169	1.68E-02	9.030	1.48E-03	Aldo/keto reductase	<i>Fragaria × ananassa</i>	4e-120	AY703448.1
gene34259	-32.058	2.13E-04	50.796	9.43E-04	Beta-1,4-glucanase (FaEG1)	<i>Fragaria × ananassa</i>	2.00E-55	AJ414709.1
gene06191	-41.072	7.61E-04	8.972	2.24E-04	Beta-1,4-glucanase (Cel1)	<i>Fragaria × ananassa</i>	0.00E+00	AF074923.1
gene31094	-49.789	1.86E-04	6.114	1.12E-03	Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.00E-71	NM_1011170.3
gene34867	-25.564	6.07E-04	21.150	1.64E-02	endo-1,4-beta-glucanase	<i>Fragaria × ananassa</i>	4.00E-45	AJ414709
gene26030	-110.716	1.12E-07	4.445	4.62E-03	Expansin 3 (Exp3)	<i>Populus tremula</i>	3.00E-125	AY435101.1
gene16186	-12.426	8.28E-06	3.612	3.30E-03	Glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.00E+00	NM_119498.3
gene17555	-20.381	6.39E-03	2.247	2.25E-03	Pectate lyase B	<i>Fragaria × ananassa</i>	0.00E+00	AF339024.1
gene05463	-3.476	1.83E-02	3.054	1.03E-03	Pectin methylesterase 2 (ATPME2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.00E+00	U25649.1
gene19241	-286.208	6.22E-04	3.517	2.80E-03	Polygalacturonase	<i>Fragaria × ananassa</i>	0.00E+00	AY280662.1

In a Y2H system, FaBOP1 interacts with FaMYB10, a R2R3 MYB transcription factor which is a major regulator of the anthocyanin production in fruit receptacle.

As plant-specific transcriptional co-activators, FaBOP1 proteins must interact with transcriptional factors to carry out its function (Khan et al., 2014). Our transcriptomic results suggested that FaBOP1 protein could interact “*in vivo*” with FaMYB10 and in this way contribute to the regulation of the flavonol/phenylpropanoid metabolism. To determine this possibility, a yeast-two-hybrid strategy was employed by co-expressing FaBOP1 fused to the GAL4 DNA-binding domain (BD) and a FaMYB10 fused to the GAL4 DNA-activating domain (AD) and vice versa. The ability of yeast cells to grow on synthetic medium lacking His, Leu, and Trp and supplemented with 10mM 3-aminotriazole was scored as a positive interaction. We found growth in the interactions between FaBOP1 and FaMYB10 in both combination of vectors (Figure 8), and also, as was expected, in the positive control interaction between FabHLH3 and FaMYB9 that was used as a positive control interaction (Schaart et al., 2012). These results indicated that FaBOP1 is able to interact physically as co-activator with FaMYB10, suggesting that both would act synergistically in the regulation of phenylpropanoid pathway.

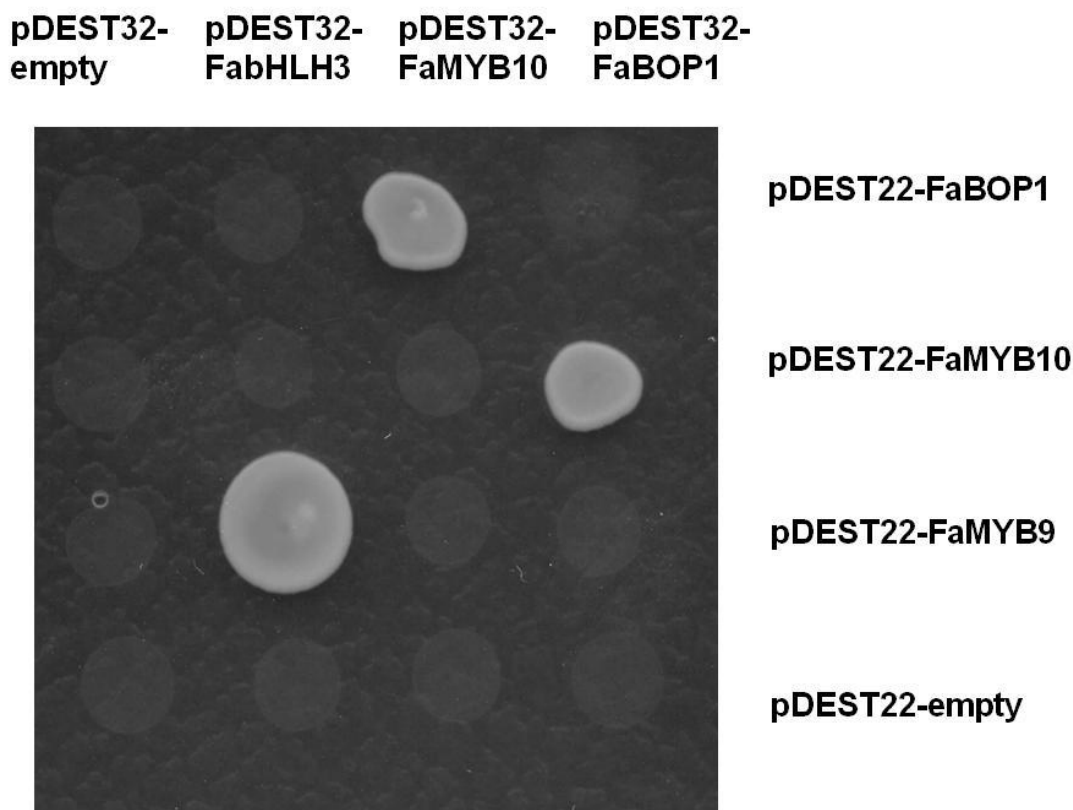


Figure 8: Y2H assay for the interaction between FaBOP1 and FaMYB10. ORFs of the *FaBOP1* and *FaMYB10* TFs were recombined into the bait vector (pDEST32) and prey vector (pDEST22). The yeast strains used for the drop test were PJ69-4a (MAT α) and PJ69-4 α (MAT α). pDEST32-FabHLH3 and pDEST22-FaMYB9 were used as positive control. The empty vectors pDEST22 or pDEST32 were also cotransformed as negative controls. The ability of yeast cells to grow on SD medium lacking –Leu-Trp-His but containing 10mM of 3-aminotriazole (3-AT) was scored as a positive interaction.

***FaBOP1* down-regulation changes metabolite composition in strawberry fruit receptacle.**

To confirm the feasibility of the transcriptomic data and its relevance on the metabolism of ripen receptacles we carried out comparative metabolomics studies of the primary and secondary metabolites in both transgenic and non transgenic fruits. We observed several changes in metabolite content after silencing *FaBOP1* gene expression. Afterwards, we analyzed statistically, by PCA, the observed variations in metabolite content. PCA analysis required the using of two main components that accounted for a total of 75.5% of the detected variation (Figure S3). This PCA analyses showed us that both populations of control fruits and RNAi silenced genes were clearly separated. The horizontal axe explained 53,9% of the variance, and was mainly due to changes involved in the content of metabolites implied in the flavonoid and anthocyanin pathways, and some sugars and amino acids. The vertical axe accounted for a total of 21,4% of explained variance and was mainly due to urea, citrate and other minor components related to changes in the ripening state of the fruit.

In regards to the primary metabolism, the correlation analysis shown in Figure S4 strongly agrees with that of the PCA analysis. A negative correlation was found between the content of plain sugars (fructose, maltose, sucrose and glucose) and amino acids coming direct or indirectly from the Krebs cycle (Glu, Asp, Ala, Tre, Pro and Ser) with those amino acids whose biosynthesis comes from sugar intermediates (Trp, Phe, Asn, Ile, Gln and His) (Figure S5).

As previously indicated, fruits that were silenced for the *FaBOPI* gene did not develop red color in treated fruits, thus indicating that the anthocyanin pathway was blocked. In accordance, in *FaBOPI*-RNAi fruits, we observed substantial lower amounts of flavonols, quercetin and kaempferol, as well as of anthocyanins such as cyanidin-3-glucoside, pelargonidine-3-glucoside. These metabolic results are consistent with the transcriptomic data.

Additionally, a clear and significant reduction in the amount of sugar compounds (raffinose, galactose, sucrose, glucose-6-phosphate, and maltose) was found in the transgenic fruits (Figure 9), probably due to a defective starch hydrolysis. This would be consistent with the down-regulation presented by some enzymes involved in the carbohydrates metabolism in the transgenic fruits.

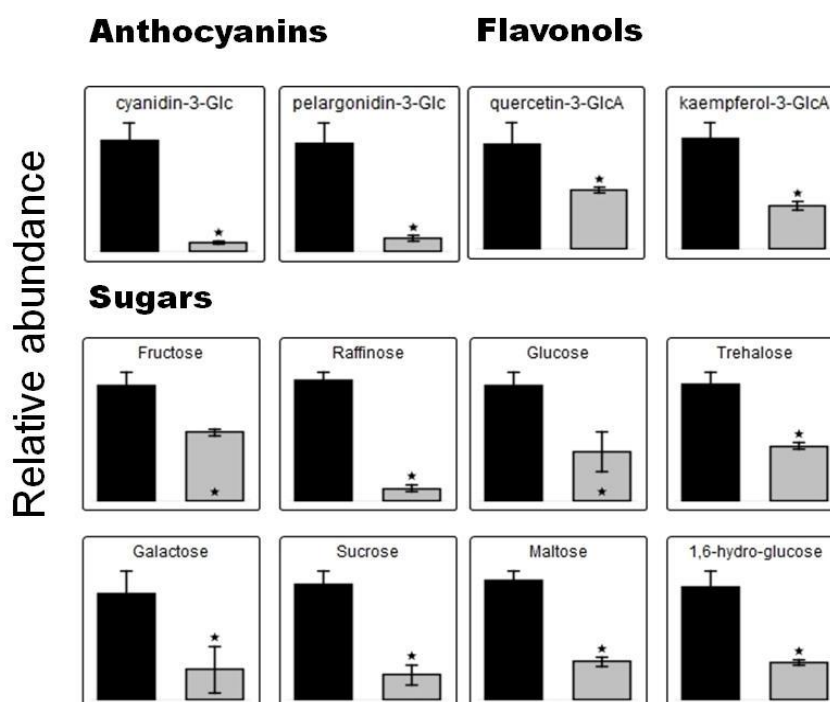


Figure 9. Analysis of primary and secondary metabolites by GC/MS and LC/MS of *FaBOPI*-RNAi fruit (grey) versus control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector (black). Mean values \pm SD of four independent extractions are shown. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test. (*) *p*-value < 0.001.

Discussion

BOP are plant specific genes, although the physiological roles played by the proteins coded by these genes are not studied in depth. However, it has been recently shown that play an essential role in many developmental processes as embryogenesis, meristem determinancy, leaf patterning, floral induction and nodule development (Andres et al., 2015; Ding et al., 2015; Frankowski et al., 2015; Tavakol et al., 2015; Couzigou et al., 2016).

So far, the role played by BOP proteins throughout the process of fruit development and ripening is completely unknown. This report presents the first functional characterization of a BOP-like gene that plays, in this process, functional roles still not described.

***FaBOP1* expression is ripening-related and hormonally regulated and co-regulates with the expression of those genes that are related to the organoleptic properties of strawberry fruit receptacle.**

Similarly to the vast majority of genes related to the organoleptic properties of strawberry fruit receptacle, the expression of *FaBOP1* gene was also fruit-receptacle specific and ripening-related (Medina-Escobar et al., 1997; Moyano et al., 1998; Trainotti et al., 1999; Blanco-Portales et al., 2002; Benítez-Burraco et al., 2003; Blanco-Portales et al., 2004; Raab et al., 2006; Griesser et al., 2008; Cumplido-Laso et al., 2012; Molina-Hidalgo et al., 2013; Medina-Puche et al., 2015; Molina-Hidalgo et al., 2015). These results indicate that *FaBOP1* could act as a transcriptional co-activator of many of the ripening related genes and expressed in ripen receptacles and which expression was activated by a high ratio ABA/auxins, ratio that determines the transition between fruit development and ripening (Perkins-Veazie, 1995; Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Li et al., 2015). Literature widely describes that auxins and abscisic acid are the two main hormones that control strawberry fruit receptacle development and ripening processes, whilst the balance between both hormones determines the trigger towards maturation and associated inherent physiological changes (Perkins-Veazie, 1995; Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Medina-Puche et al., 2014). This dual regulation has also been observed for other genes whose expression is also up-regulated throughout the strawberry fruit ripening process (Cumplido-Laso et al., 2012; Daminato et al., 2013; Molina-Hidalgo et al., 2013; Molina-Hidalgo et al., 2015). It was noteworthy that the expression pattern of two R2R3-MYB transcription factors, *FaMYB10* (Medina-Puche et al., 2014) and *FaEOBII* (Medina-Puche et al., 2015) was identical to that observed for *FaBOP1*. However, while *FaMYB10* or *FaBOP1* gene silencing renders the same phenotype characterized by a lack of anthocyanins content in fruit receptacle, this phenotype was not observed when the expression of *FaEOBII* was silenced

(Medina-Puche et al., 2015). These results indicate a putative relationship between FaBOP1 and FaMYB10.

FaBOP1 physically interacts with FaMYB10 TF

As coactivators, BOP proteins must interact with transcription factors to carry out its function. Nevertheless, the physical interaction between BOP and transcription factor proteins has been scarcely studied. In this sense, by using a Y2H hybrid analysis, it has been shown that in tomato, that BOPa interacts with the transcription factor LSH3b and bind as a LSH3b/BOP complex to the *PTS* promoter, a key regulator of natural variation in leaf complexity, motivating the down-regulation of *PTS* and *PTS-GNM* (peripheral gene network modules) gene expression and in this way decreasing leaf complexity (Ichihashi et al., 2014). BOP belong and regulate the GNM and regulate through its direct interaction with LSH3b, regulate the effective concentration of KNOTTED-like HOMEBOX influencing the leaf complexity (Ichihashi et al., 2014). Similarly, keeping the same experimental approach, we have demonstrated a direct physical interaction between FaBOP1 and FaMYB10, what strongly supports an interaction between both regulatory proteins along the receptacle fruit ripening. Besides, as in the case of others BOP proteins (Hepworth et al., 2005; Wu et al., 2012), FaBOP1 is located in both cytoplasm and nucleus what further strengthens the regulatory interaction of both proteins influencing the expression of many ripening-related genes.

FaBOP1 regulates expression of *FaMYB10* TF and other genes related to F/P biosynthesis in strawberry fruit receptacles.

The proposal above mentioned is reinforced by the fact that comparative transcriptomic analyses between the genes expressed in *FaBOP1*-RNAi-silenced receptacles versus control receptacles, showed down-regulation of the expression of a reduced subset of genes. Many of the proteins whose corresponding genes showed a down-regulated expression are involved in the early, late and transport steps of F/P metabolism and anthocyanin biosynthesis (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *DFR*, *CCR*, *MATE*). Interestingly, many of the genes whose expression was diminished in the receptacle of fruits where the expression of *FaBOP1* was silenced, were common to that previously down regulated in *FaMYB10* silenced receptacle (Medina-Puche et al., 2014).

The transcriptomic and metabolomic data were correlated, clearly supporting that FaBOP1, through its interaction with FaMYB10, regulates the expression pattern of genes belonging to the flavonoid metabolism. Thus, a drastic reduction in the content of cyanidin-3-glucoside and

pelargonidine-3-glucoside, the two main anthocyanins present in the strawberry fruit receptacle and that determine the red color of the ripe fruit (Crecente-Campo et al., 2012; Ornelas-Paz Jde et al., 2013). In fact, similar changes in these anthocyanins were also observed in fruit receptacles where the expression of *FaMYB10* was silenced (Medina-Puche et al., 2014).

Usually, changes in the end-products of metabolic pathways are accompanied of metabolite variations in intermediates in those pathways (Vallarino et al., 2015). That could be the case of other metabolites analyzed as sugars that are present at significant lower concentrations in the *FaBOP1* silenced fruits. Apparently *FaBOP1* could influence some aspects of the carbohydrate metabolism, but probably its action would be executed through its interaction with key enzymes of the corresponding metabolic pathway, for instance the regulatory enzyme hexokinase (Rolland et al., 2006; Zhang et al., 2014).

Besides, the expression of genes involved in cell wall metabolism was also down-regulated in the transcriptome of fruit receptacles in which the expression of *FaBOP1* was silenced. Previously, *BOP* genes have been related with the processes that give rise to the abscission zone (AZ) (Kim, 2014). Abscission and fleshy fruit ripening processes share common events. Thus, the abscission is divided into 4 developmental phases that culminate in complete organ separation: Phase (1) establishment of AZ; Phase (2) acquisition of competence for activation of abscission; Phase (3) cell separation; and Phase (4) organ separation and trans-differentiation between the proximal and distal sides of the cells (Kim, 2014). During the phase three, as in the case of receptacle fruit ripening, an increase in the activity of the cell wall hydrolytic enzymes is produced, what contributes to the disassembly of the cell wall matrix and its loosening, determining cell separation in this AZ zone (Kim, 2014). It has been described that in the abscission phases 3 and 4, the expression of genes that encode numerous cell wall hydrolases, such as xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*XTH*), expansins (*EXP*), cellulase and polygalacturonase, are up-regulated (Kim, 2014). In a similar way, the strawberry receptacle fruit softening is associated with an expression increased of genes that encode pectate lyases (*PL*) (Medina-Escobar et al., 1997; Benítez-Burraco et al., 2003), polygalacturonase (*PG*) (Redondo-Nevado et al., 2001; Garcia-Gago et al., 2009; Quesada et al., 2009), cellulases (*Cel*) (Llop-Tous et al., 1999; Trainotti et al., 1999), expansins (*EXP*) (Harrison et al., 2001), xylosidase (*Xyl*) (Bustamante et al., 2006) and pectin methyl esterases (*PE*) (Castillejo et al., 2004; Osorio et al., 2011). Our microarray analysis showed us that genes coding celulasas (GENE34259, GENE06191, GENE34867), expansin (GENE26030), pectate lyase (GENE17555), polygalacturonase (GENE19241), pectin methyl esterase (GENE05463), decreased its expression in fruit receptacle, where the expression of the gene *FaBOP1* was silenced. Thus, in both abscission and fruit ripening processes, *BOP* genes could play similar

regulatory functions. However, the expression of these genes were not down-regulated in *FaMYB10* silenced fruit receptacle that indicates that *FaBOP1* must also interact with another transcription factors in order to play its regulatory function.

The down-regulation of *FaBOP1* gene expression also motivated the decrease of *FaMYB10* expression, indicating a potential regulation of its own promoter by *FaMYB10* in collaboration with *FaBOP1*, probably as a fine tuning mechanism of *FaMYB10* transcription.

Additionally, the expression of genes that code proteins that are involved in the aroma biosynthesis in ripen receptacles as, alcohol acyl transferases (GENE07931, GENE33976, GENE34009, GENE34010, GENE34008), or quinone oxidoreductase (*FaQR*) (GENE28407) was also decreased (Table S4). These data indicate the existence of a clear relation between *FaBOP1* expression and aroma production in ripen receptacles.

The relationship observed between *FaBOP1* expression and that corresponding to genes that codify cell wall hydrolases, or enzymes related to the aroma production could be indirect. In this sense, *FaBOP1* would act by regulating the expression of ripening-related genes that encode different transcription factors as, MYBs (GENE25060, GENE20888, GENE02643), AP2/ERFs (GENE04916, GENE32084), WRKYs (GENE28720, GENE03411) or bZIP (GENE25544), and which expression was down-regulated in *FaBOP1* silenced receptacles. These TFs would regulate de expression of those genes encoding enzymes related with cell wall degradation or aroma biosynthesis. An indirect relationship between BOP genes and transcription factors expression has been previously reported in tomato for the case of the activation of the hub gene PETROSELINUM (PTS) expression. After its activation PTS binds to BIP protein allowing that the transcription factor LeT6 penetrates inside the nucleus activating the expression of many genes in the core network (C1-C3) that influence in leaf complexity (Ichihashi et al., 2014).

Conclusion

Our study has revealed the role for the BOP-like coactivator *FaBOP1*, which bind to the transcription factor R2R3-MYB10 and in this way, to regulate the F/P biosynthesis. The dramatic effect in the phenotype and metabolic profile by the transient silencing clearly shows the importance of the role played, as a co-activator, by *FaBOP1* in strawberry fruit receptacle. Thus, the most important molecular and metabolic changes associated with ripening, are affected by *FaBOP1* silencing.

References

- Aharoni A, De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP** (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal* 28: 319-332
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AMML, De Vos RCH, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP** (2000) Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *The Plant Cell* 12: 647-661
- Almeida JRM, D'Amico E, Preuss A, Carbone F, de Vos CHR, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG, Martens S, Rosati C** (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465: 61-71
- Andres F, Romera-Branchat M, Martinez-Gallegos R, Patel V, Schneeberger K, Jang S, Altmüller J, Nurnberg P, Coupland G** (2015) Floral Induction in Arabidopsis by FLOWERING LOCUS T Requires Direct Repression of BLADE-ON-PETIOLE Genes by the Homeodomain Protein PENNYWISE. *Plant Physiol* 169: 2187-2199
- Aragüez I, Osorio S, Hoffmann T, Rambla JL, Medina-Escobar N, Granell A, Botella MÁ, Schwab W, Valpuesta V** (2013) Eugenol Production in Achenes and Receptacles of Strawberry Fruits Is Catalyzed by Synthases Exhibiting Distinct Kinetics. *Plant Physiology* 163: 946-958
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS** (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37: W202-208
- Benítez- Burraco A, Blanco- Portales R, Redondo- Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero JL, Muñoz- Blanco J** (2003) Cloning and characterization of two ripening- related strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* 54: 633-645
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57: 289-300
- Blanco-Portales R, Lopez-Raez JA, Bellido ML, Moyano E, Dorado G, Gonzalez-Reyes JA, Caballero JL, Munoz-Blanco J** (2004) A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Mol Biol* 55: 763-780
- Blanco-Portales R, Medina-Escobar N, Lopez-Raez JA, Gonzalez-Reyes JA, Villalba JM, Moyano E, Caballero JL, Munoz-Blanco J** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *J Exp Bot* 53: 1723-1734
- Bustamante CA, Rosli HG, Anon MC, Civello PM, Martinez GA** (2006) beta-Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Sci* 171: 497-504
- Castillejo C, de la Fuente JI, Iannetta P, Botella MA, Valpuesta V** (2004) Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *J Exp Bot* 55: 909-918

- Chai YM, Jia HF, Li CL, Dong QH, Shen YY** (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* 62: 5079-5089
- Couzigou JM, Magne K, Mondy S, Cosson V, Clements J, Ratet P** (2016) The legume NOOT-BOP-COCH-LIKE genes are conserved regulators of abscission, a major agronomical trait in cultivated crops. *New Phytol* 209: 228-240
- Crecente-Campo J, Nunes-Damaceno M, Romero-Rodríguez MA, Vázquez-Odériz ML** (2012) Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis* 28: 23-30
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, Hoffmann T, Sinz Q, Ring L, Studart-Wittkowski C, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2012) The fruit ripening-related gene FaAAT2 encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany* 63: 4275-4290
- Daminato M, Guzzo F, Casadoro G** (2013) A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *J Exp Bot* 64: 3775-3786
- Ding L, Yan S, Jiang L, Zhao W, Ning K, Zhao J, Liu X, Zhang J, Wang Q, Zhang X** (2015) HANABA TARANU (HAN) Bridges Meristem and Organ Primordia Boundaries through PINHEAD, JAGGED, BLADE-ON-PETIOLE2 and CYTOKININ OXIDASE 3 during Flower Development in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 11: e1005479
- Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz F, de los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (2009) Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) Fa WRKY1 and *Arabidopsis* At WRKY75 proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany* 60: 3043-3065
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Kopcewicz J** (2015) Profiling the BLADE-ON-PETIOLE gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1-7
- Garcia-Gago JA, Pose S, Munoz-Blanco J, Quesada MA, Mercado JA** (2009) The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signal Behav* 4: 766-768
- Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Munoz-Blanco J, Schwab W** (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) achene and receptacle. *J Exp Bot* 59: 2611-2625
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC** (2004) BLADE-ON-PETIOLE1 Encodes a BTB/POZ Domain Protein Required for Leaf Morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 1361-1370
- Ha CM, Kim G-T, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG** (2003) The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130: 161-172
- Halouska S, Powers R** (2006) Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data. *J Magn Reson* 178: 88-95

- Harrison EP, McQueen-Mason SJ, Manning K** (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J Exp Bot* 52: 1437-1446
- Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn GW** (2005) BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 1434-1448
- 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. *Plant J* 48: 818-826
- Ichihashi Y, Aguilar-Martinez JA, Farhi M, Chitwood DH, Kumar R, Millon LV, Peng J, Maloof JN, Sinha NR** (2014) Evolutionary developmental transcriptomics reveals a gene network module regulating interspecific diversity in plant leaf shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2616-2621
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol* 157: 188-199
- Jimenez-Bermudez S, Redondo-Nevado J, Munoz-Blanco J, Caballero JL, Lopez-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA** (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128: 751-759
- Jun JH, Ha CM, Fletcher JC** (2010) BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in arabidopsis by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *Plant Cell* 22: 62-76
- Khan M, Xu H, Hepworth SR** (2014) BLADE-ON-PETIOLE genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Science* 215–216: 157-171
- Kim J** (2014) Four shades of detachment: regulation of floral organ abscission. *Plant Signal Behav* 9: e976154
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21: 1635-1638
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology (N Y)* 9: 963-967
- Li D, Li L, Luo Z, Mou W, Mao L, Ying T** (2015) Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Influence of Abscisic Acid on the Metabolism of Pigments, Ascorbic Acid and Folic Acid during Strawberry Fruit Ripening. *PLoS One* 10: e0130037
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1: 387-396
- Llop-Tous I, Dominguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M** (1999) Characterization of two divergent endo-beta-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* 119: 1415-1422
- Lunkenbein S, Salentijn EM, Coiner HA, Boone MJ, Krens FA, Schwab W** (2006) Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *J Exp Bot* 57: 2445-2453
- Manning K** (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205: 622-631

- Medina-Escobar N, Cardenas J, Moyano E, Caballero JL, Munoz-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 Mol Biol* 34: 867-877
- Medina-Escobar N, Cardenas J, Valpuesta V, Munoz-Blanco J, Caballero JL** (1997) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Anal Biochem* 248: 288-296
- Medina-Puche L, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Cumplido-Laso G, García-Caparros N, Moyano-Cañete E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Rodríguez Franco A** (2016) Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Functional & Integrative Genomic*, DOI: 10.1007/s1014201605103
- Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F, Hoffmann T, Ring L, Rodríguez-Franco A, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2014) MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* 65: 401-417
- Medina-Puche L, Molina-Hidalgo FJ, Boersma M, Schuurink RC, Lopez-Vidriero I, Solano R, Franco-Zorrilla JM, Caballero JL, Blanco-Portales R, Munoz-Blanco J** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiol* 168: 598-614
- Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2013) The strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of Experimental Botany* 64: 1471-1483
- Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Gelis S, Ramos J, Sabir F, Soveral G, Prista C, Iglesias-Fernandez R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2015) Functional characterization of FaNIP1;1 gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Sci* 238: 198-211
- Moyano E, Portero-Robles I, Medina-Escobar N, Valpuesta V, Munoz-Blanco J, Caballero JL** (1998) A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol* 117: 711-716
- Nodzon LA, Xu WH, Wang Y, Pi LY, Chakrabarty PK, Song WY** (2004) The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* 40: 996-1006
- Norberg M, Holmlund M, Nilsson O** (2005) The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development* 132: 2203-2213
- Ornelas-Paz Jde J, Yahia EM, Ramirez-Bustamante N, Perez-Martinez JD, Escalante-Minakata Mdel P, Ibarra-Junquera V, Acosta-Muniz C, Guerrero-Prieto V, Ochoa-Reyes E** (2013) Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chem* 138: 372-381
- Osorio S, Bombarely A, Giavalisco P, Usadel B, Stephens C, Araguez I, Medina-Escobar N, Botella MA, Fernie AR, 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. *J Exp Bot* 62: 2855-2873

Pedersen S (2001) Multiplex relative gene expression analysis by real-time RT-PCR using the iCycler iQTM detection system. *BioRadiations (BioRad)* 107: 10-11

Pérez AG, Sanz C, Olías R, Ríos JJ, Olías JM (1996) Evolution of Strawberry Alcohol Acyltransferase Activity during Fruit Development and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3286-3290

Perkins-Veazie P (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Review* 17: 267-297

Pillet J, Yu HW, Chambers AH, Whitaker VM, Folta KM (2015) Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *J Exp Bot* 66: 4455-4467

Pombo MA, Martinez GA, Civello PM (2011) Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Sci* 181: 111-118

Quesada MA, Blanco-Portales R, Pose S, Garcia-Gago JA, Jimenez-Bermudez S, Munoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Munoz-Blanco J (2009) Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiol* 150: 1022-1032

Raab T, Lopez-Raez JA, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Munoz-Blanco J (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell* 18: 1023-1037

Redondo-Nevado J, Moyano E, Medina-Escobar N, Caballero JL, Munoz-Blanco J (2001) A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *J Exp Bot* 52: 1941-1945

Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR (2001) High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies. *Plant Physiol* 127: 749-764

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709

Saleh O, Issman N, Seumel GI, Stav R, Samach A, Reski R, Frank W, Arazi T (2011) MicroRNA534a control of BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 mediates juvenile-to-adult gametophyte transition in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 65: 661-674

Salvatierra A, Pimentel P, Moya-Leon MA, Herrera R (2013) Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry* 90: 25-36

Schaart JG, Dubos C, Romero De La Fuente I, van Houwelingen AM, de Vos RC, Jonker HH, Xu W, Routaboul JM, Lepiniec L, Bovy AG (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *New Phytol* 197: 454-467

Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* 579: 1332-1337

- Seymour GB, Ryder CD, Cevik V, Hammond JP, Popovich A, King GJ, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Manning K** (2011) A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J Exp Bot* 62: 1179-1188
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton J-M, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Rojas JJR, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troglio M, Viola R, Ashman T-L, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Girona EL, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet* 43: 109-116
- Tavakol E, Okagaki R, Verderio G, Shariati JV, Hussien A, Bilgic H, Scanlon MJ, Todt NR, Close TJ, Druka A, Waugh R, Steuernagel B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Stein N, Muehlbauer GJ, Rossini L** (2015) The barley *Uniculme4* gene encodes a BLADE-ON-PETIOLE-like protein that controls tillering and leaf patterning. *Plant Physiol* 168: 164-174
- Tohge T, Fernie AR** (2010) Combining genetic diversity, informatics and metabolomics to facilitate annotation of plant gene function. *Nat Protoc* 5: 1210-1227
- Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G** (1999) A novel E-type endo-beta-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol Biol* 40: 323-332
- Vallarino JG, Osorio S, Bombarely A, Casanal A, Cruz-Rus E, Sanchez-Sevilla JF, Amaya I, Gialalisco P, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V** (2015) Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytol* 208: 482-496
- Wentzell PD, Andrews DT, Hamilton DC, Faber K, Kowalski BR** (1997) Maximum likelihood principal component analysis. *Journal of Chemometrics* 11: 339-366
- Wu X-M, Yu Y, Han L-B, Li C-L, Wang H-Y, Zhong N-Q, Yao Y, Xia G-X** (2012) The Tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 Gene Mediates Differentiation of the Corolla Abscission Zone by Controlling Longitudinal Cell Expansion. *Plant Physiology* 159: 835-850
- Yang Y, Zhang Y, Ding P, Johnson K, Li X** (2012) The ankyrin-repeat transmembrane protein BDA1 functions downstream of the receptor-like protein SNC2 to regulate plant immunity. *Plant Physiol* 159: 1857-1865
- Yoo J, Shin DH, Cho MH, Kim TL, Bhoo SH, Hahn TR** (2011) An ankyrin repeat protein is involved in anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Physiol Plant*. 142: 314-325. doi: 310.1111/j.1399-3054.2011.01468.x. Epub 02011 Apr 01413.
- Zhang Y, Zhen L, Tan X, Li L, Wang X** (2014) The involvement of hexokinase in the coordinated regulation of glucose and gibberellin on cell wall invertase and sucrose synthesis in grape berry. *Molecular Biology Reports* 41: 7899-7910.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CHAPTER 1

1. The strawberry *FaRGlyase1* gene shows significant homology of sequence with a conserved rhamnogalacturonate lyase domain, which was also present in other putative *RGlyase* sequences deposited in the data-bases.
2. The expression of *FaRGlyase1* occurred mainly in the receptacle concurrently with ripening, and it was positively regulated by ABA and negatively by auxins.
3. *FaRGlyase1* protein is involved in the degradation of cell-wall middle lamellae in fruit receptacle. The QTL analysis showed that the *FaRGlyase1* gene is linked to a group of genes implied in fruit firmness.
4. *FaRGlyase1* plays an important key role in the fruit ripening-related softening process that reduces the firmness and post-harvest life of the fruit.

CHAPTER 2

5. *FaNIP1;1* deduced protein belongs to the NIP (nodulin-26-like intrinsic proteins) subgroup of MIPs proteins.
6. *FaNIP1;1* is a ripening - and drought-related gene and is positively regulated by ABA and negatively by auxins.
7. *FaNIP1;1* is located in plasma membrane and transports water and some small non-ionic solute molecules.
8. *FaNIP1;1* may play a key role in maintaining water cellular homeostasis increasing the membrane permeability in the ripen strawberry fruit cells.

CHAPTER 3

9. *FaDOF2* is a DOF-type transcription factor, located in the nucleus, and is an hormonal and ripening-related transcription factor.

10. *FaDOF2* expression correlates with eugenol production in different strawberry plant tissues.
11. *FaDOF2* regulates two key genes, *FaEOBII* and *FaEGS2*, related to eugenol biosynthesis in strawberry fruit receptacles.
12. In ripe receptacles, eugenol production is regulated by the physical interaction between *FaDOF2* and *FaEOBII*, a R2R3 MYB TF, through control of the *FaEGS2* expression.

CHAPTER 4

13. *FaBOP1* is a gene that encodes BTB-ankyrin protein of BLADE-ON-PETIOLE (BOP) class. *FaBOP1* was localized in both nucleus and cytoplasm of the cells.
14. The *FaBOP1* expression is ripening-related, preferentially expressed in fruit receptacle and hormonally regulated positively by ABA and negatively by auxins.
15. *FaBOP1* acts as co- regulator of the expression of ripening related genes related with the secondary metabolism. *FaBOP1* regulates expression of *FaMYB10* TF and other genes related to F/P biosynthesis in strawberry fruit receptacles.
16. *FaBOP1* interacts with *FaMYB10*, a R2R3 MYB transcription factor which is a major regulator of the anthocyanin production in fruit receptacle, suggesting that both would act synergistically in the regulation of phenylpropanoid pathway.
17. *FaBOP1* down-regulation changes metabolite composition in strawberry fruit receptacle.

ADDITIONAL FILES

ADDITIONAL FILES

SUMMARY GENERAL METHODS

Additional table 1.

Gene expression values of different housekeeping genes obtained by qRT-PCR analysis. Experiment A: throughout the development and ripening of strawberry fruit. Experiment B: in vegetative tissues against strawberry red fruit. Experiment C: in de-achened G2 fruits against control G2 fruits. Reactions normalized using the Ct value corresponding to a strawberry interspacer 26S-18S gene for quantification as described in Materials and Methods. Ct values used as reference were assigned an arbitrary value equal to unity. The increase in mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value for experiment A, to the receptacle R-Ct value for experiment B and to the control G2-fruits-Ct for experiment C. G1: small-sized green fruits; G2: middle-sized green fruits; G3: full-sized green fruits; W: white fruits; R: full-ripe red fruits.

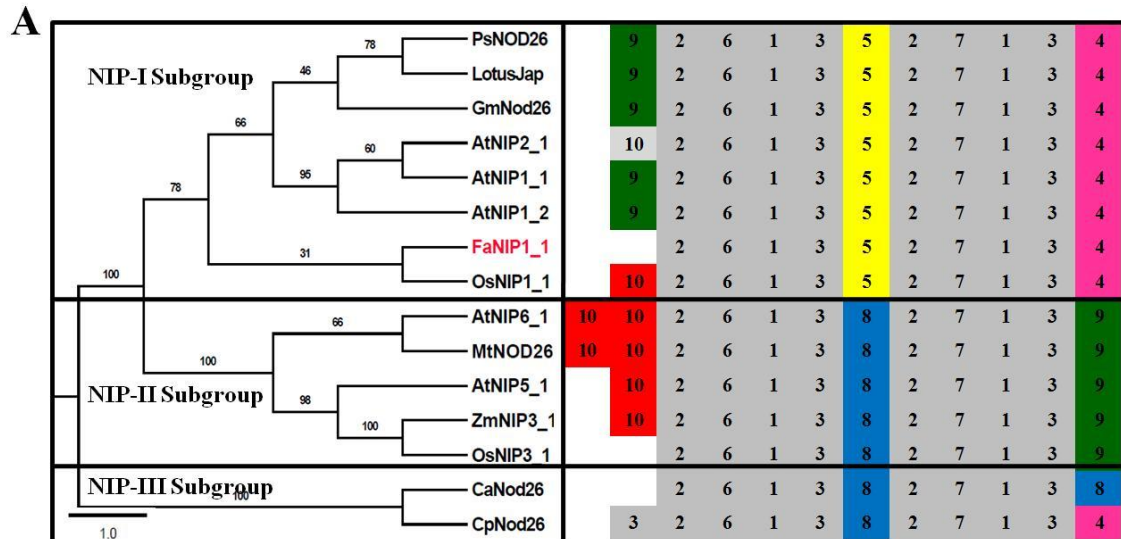
<i>QRT-PCR Analysis</i>							
Housekeeping genes	Experiment A					Experiment B Vegetative tissues vs Red fruits	Experiment C De-achened G2 fruits vs G2 fruits
	G1	G2	G3	W	R		
<i>C11G1RB</i>	1.15	0.92	1.21	1.1	0.99	0.98	1.09
<i>C13A2R</i>	1.06	1.2	1.15	0.9	1.19	1.13	0.99
<i>C13H1RA</i>	1.22	0.98	0.97	1.3	1.09	0.98	1.02
<i>C13F7R</i>	0.97	1.15	1.27	0.9	0.98	1.12	1.02
<i>C23B5R</i>	1.01	1.07	1.3	1.2	1.19	0.97	1.03
<i>C32H7R</i>	0.99	0.98	1.25	1.2	1.4	1.01	1.02
<i>C31H3R</i>	1.12	0.97	1.31	1.4	0.99	0.98	0.99
<i>C13E12R</i>	0.98	1.25	1.3	0.9	1.24	1.11	0.98
<i>Interspacer 26S-18S</i>	1.01	0.99	1.1	1.0	0.98	1.02	1.03

CHAPTER 1

CHAPTER 2

Table S1. Major characteristic of FaNIP1;1, AtNIP1;1 and AtNIP1;2 proteins. PI and Mw were calculated using Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Subcellular location was predicted by Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) and Wolfpsort (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html).

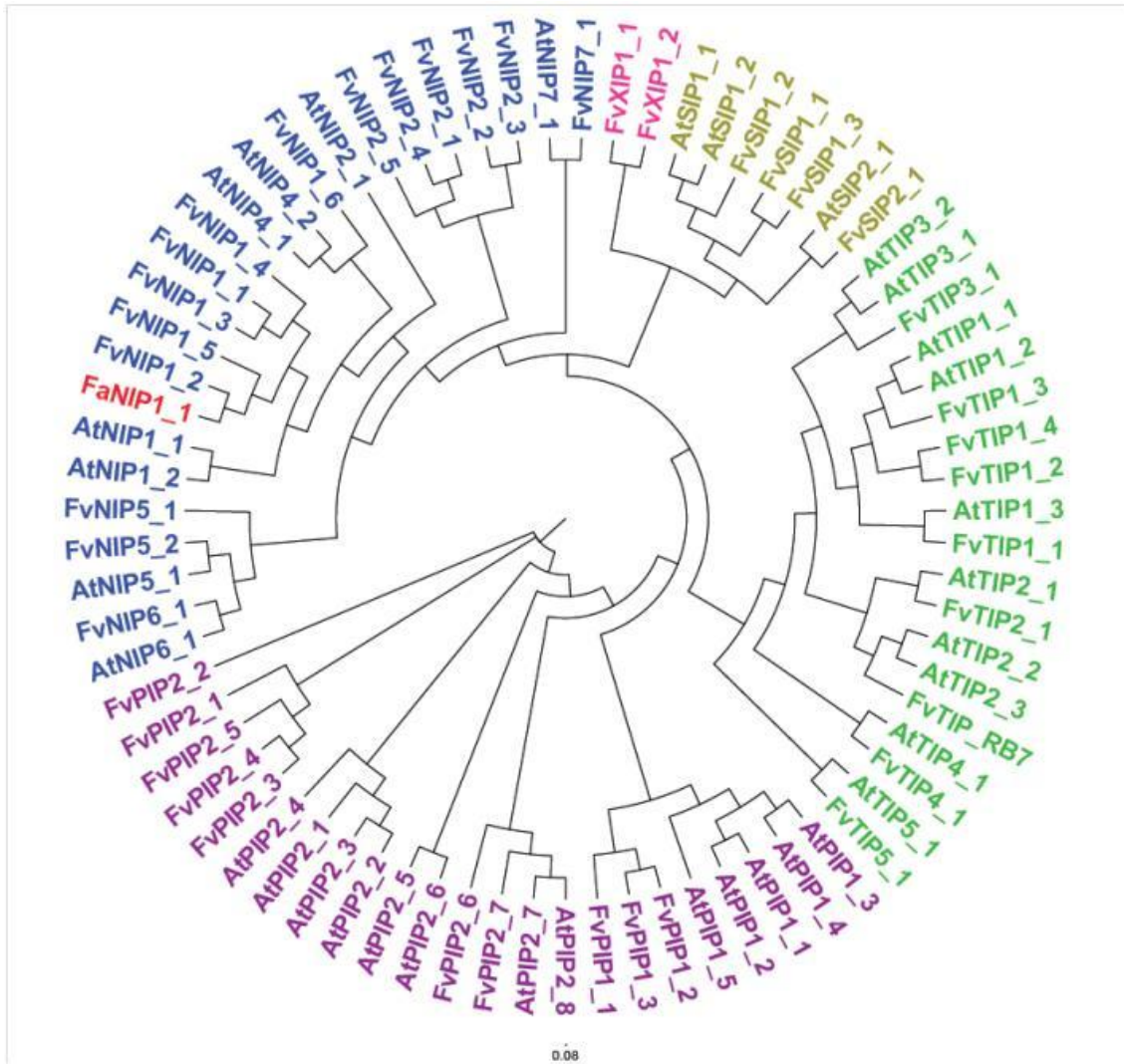
	FaNIP1;1	AtNIP1;1	AtNIP1;2
NCBI Acc. No	KJ159565	NM_118021.3	NM_118008.3
ID	-	At4g19030	At4g18910
Protein size	272	308	294
pI	6.37	6.99	8.63
MW (Da)	29230.90	33031.53	31269.36
Prediction of intracellular localization of the proteins			
CELLO	PM (4.852/5)	PM (4.858/5)	PM (4.677/5)
Predotar	none	none	none
WolfPSORT	PM	PM	PM



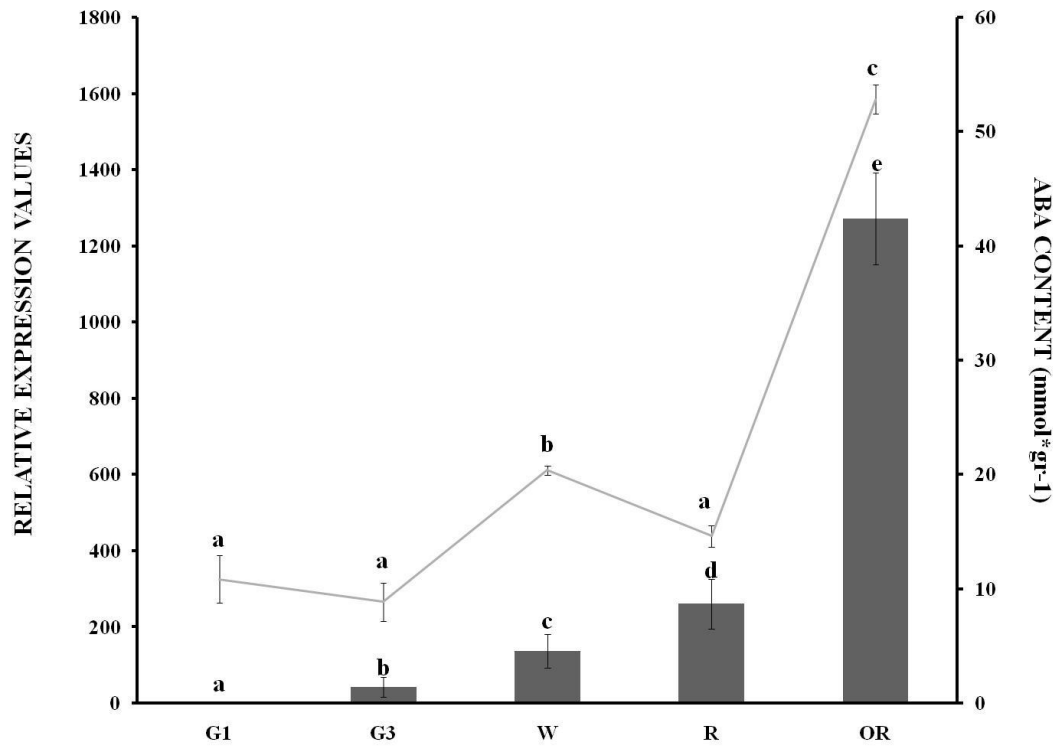
B

Motif	e-value	Consensus sequences
1	5.6e-279	[VI][LY][SI]AG[HP][ST]G[AG][SH][MF]NP[AV][RV][TS][LI][GA][FP]A
2	9.0e-318	Q[KA][LF]VAEF[IV][GI]T[FY][FIY]L[IM]F[VA][GV][CTS][AG][VA]A[TI][DV][NT][RQ]AV[GD][EGN]
3	8.7e-189	[ARV][HR][FG]P[YW][KR][QG][VI][PW][AIV]Y[LIV][VA]A[PQ][VI]LG[AS]
4	2.3e-093	GAWVYN[IV][IV]R[YF]TDKP[L]VREITKS[GS]SFLK
5	1.7e-046	TLA[SA][GA]TLRLLF[GS][GL][DKN][HQ]D[QVH][FC][SA]G[TK]
6	7.8e-040	[TS][LF][PI]G[IN][AS][IA][VC][WA]GL[AT]V[MT][VI]
7	1.1e-034	G[IL]A[VI]G[SA][TA]V[LMT]LN
8	1.9e-028	[CS]A[AS]F[AT]LK[GAL][VL][FL][HE]PF[MKL]S[GL]GVTVP
9	9.3e-014	[YE][VT][VA]V[NK][LV][KNPR][DEK][ED][DNV][ESG][EN][TQ][IKPQ][EQR]R[QS][DSR]
10	1.1e-003	[LY]E[DRK][GKS][LS]L[PK][RS][CV][KT]C

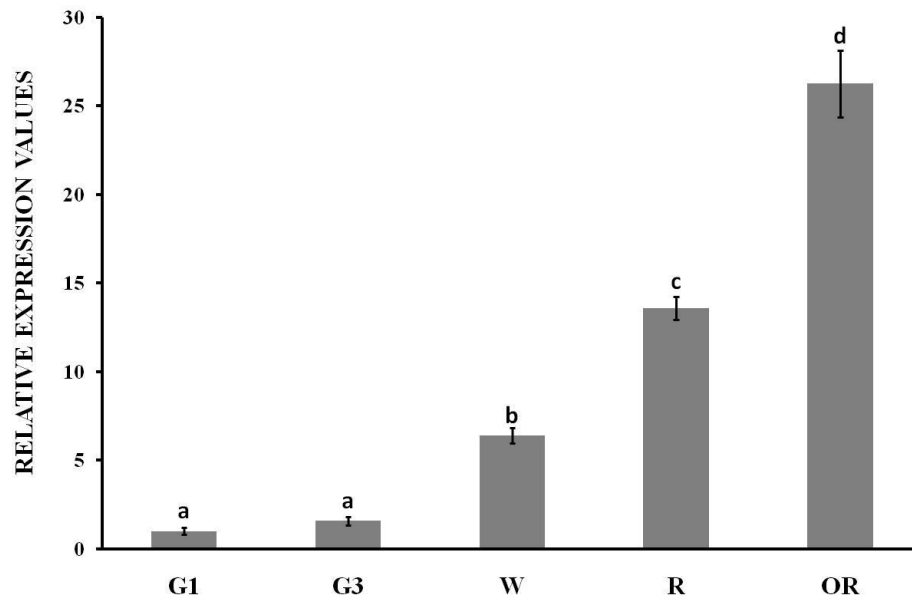
Supplemental Fig. S2: (A) Phylogenetic tree and schematic distribution of conserved motifs among the deduced sequences of the NIP proteins of the species used in this study. Bootstrapping values are indicated as percentages. (B) Sequences of conserved amino-acid motifs (MEME; Bailey et al. 2009) of the NIP proteins of the species used in this study.



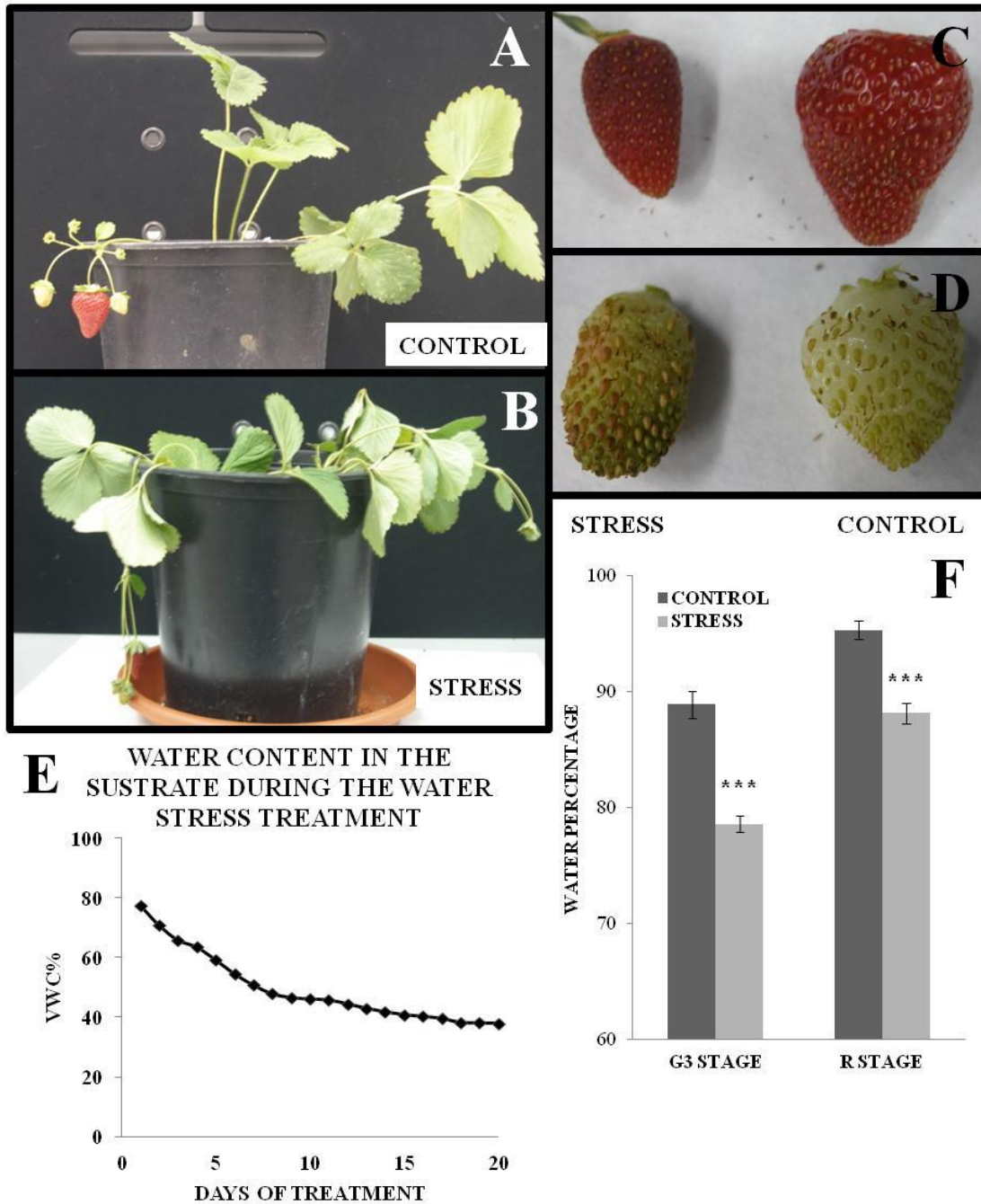
Supplemental Fig. S3: Phylogenetic tree of different MIP proteins from *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* and *Fragaria vesca* classified into the corresponding NIP, XIP, SIP, PIP, and TIP subgroups. FvPIP1;1 (GENE20927), FvPIP1;2 (GENE19301), FvPIP1;3 (GENE32503), FvPIP2;1 (GENE21573), FvPIP2;2 (GENE23293), FvPIP2;3 (GENE09724), FvPIP2;4 (GENE09722), FvPIP2;5 (GENE09721), FvPIP2;6 (GENE14554), FvPIP2;7 (GENE23712), FvTIP1;1 (GENE26700), FvTIP1;2 (GENE13973), FvTIP1;3 (GENE09792), FvTIP1;4 (GENE14275), FvTIP2;1 (GENE25767), FvTIP3;1 (GENE08966), FvTIP4;1 (GENE08828), FvTIP5;1 (GENE21204), FvNIP1;1 (GENE00277), FvNIP1;2 (GENE02878), FvNIP1;3 (GENE23793), FvNIP1;4 (GENE23794), FvNIP1;5 (GENE23795), FvNIP1;6 (GENE04069), FvNIP2;1 (GENE03812), FvNIP2;2 (GENE04461), FvNIP2;3 (GENE03789), FvNIP2;4 (GENE03813), FvNIP2;5 (GENE04463), FvNIP5;1 (GENE24303), FvNIP5;2 (GENE01819), FvNIP6;1 (GENE15857), FvNIP7;1 (GENE05927), FvSIP1;1 (GENE23950), FvSIP1;2 (GENE16797), FvSIP1;3 (GENE23951), FvSIP2;1 (GENE16181), FvXIP1;1 (GENE07368), FvXIP1;2 (GENE07369), AtPIP1;1 (At3g61430), AtPIP1;2 (At2g45960), AtPIP1;3 (At1g01620), AtPIP1;4 (At4g00430), AtPIP1;5 (At4g23400), AtPIP2;1 (At3g53420), AtPIP2;2 (At2g37170), AtPIP2;3 (At2g37180), AtPIP2;4 (At5g60660), AtPIP2;5 (At3g54820), AtPIP2;6 (At2g39010), AtPIP2;7 (At4g35100), AtPIP2;8 (At2g16850), AtTIP1;1 (At2g36830), AtTIP1;2 (At3g26520), AtTIP1;3 (At4g01470), AtTIP2;1 (At3g16240), AtTIP2;2 (At4g17340), AtTIP2;3 (At5g47450), AtTIP3;1 (At1g73190), AtTIP3;2 (At1g17810), AtTIP4;1 (At2g25810), AtTIP5;1 (At3g47440), AtNIP1;1 (At4g19030), AtNIP1;2 (At4g18910), AtNIP2;1 (At2g34390), AtNIP3;1 (At1g31880), AtNIP4;1 (At5g37810), AtNIP4;2 (At5g37820), AtNIP5;1 (At4g10380), AtNIP6;1 (At1g80760), AtNIP7;1 (At3g06100), AtSIP1;1 (At3g04090), AtSIP1;2 (At5g18290), AtSIP2;1 (At3g56950).



Supplemental Fig. S4: Developmental expression of the strawberry *FaNIP1;1* in fruit receptacle and ABA content curve (dashed line) of strawberry fruits in their different development and ripening stages. qRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaNIP1-1* gene. Quantification is based on Ct values, as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. (A) G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).



Supplemental Fig. S5: Developmental expression of the strawberry *FaNCED1* in fruit receptacle of strawberry fruits in their different development and ripening stages. qRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaNCED1* gene. Quantification is based on Ct values, as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. (A) G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).



Supplemental Fig. S6: (A-D) Appearance of strawberry plants and fruits under water stress treatment. (A) Control plant; (B) plant under water stress; strawberry control fruit and strawberry fruit under water stress of red (C) and green (D) ripening stages. (E) Measure of water content in the substrate during the water stress treatment. The treatment was applied for 20 days. VWC: volumetric water content. (F) Decrease of the water content in the red and green strawberry fruits after water stress treatment compared with a control under normal irrigation.

CHAPTER 3

Table S1. Predicted *Fragaria vesca* DOF transcription factors and related information. DOF genes expressed in *F. × ananassa* identified by comparing R stage fruit against G1 stage fruit transcriptomes. Bold font highlights differentially regulated genes. Gene ID reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics 43, 109-116) Sequence name designation is arbitrary. AA, amino acids; pI, isoelectric point of the deduced polypeptide; Mw, molecular weight.

Table S2. Total microarray data from transcriptomic comparison between transgenic transiently-silenced *FaDOF2* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics 43, 109-116).

Table S3. Gene expression values of different housekeeping genes obtained by QRT-PCR analysis. Experiment A: throughout strawberry fruit development and ripening. Experiment B: in vegetative tissues against strawberry red fruit. Experiment C: in de-achened G2 fruits against control G2 fruits. Reactions normalized using the Ct value corresponding to a strawberry interspacer 26S-18S gene for quantification as described in Materials and Methods. Ct values used as reference were assigned an arbitrary value equal to unity. The increase in mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value for experiment A, to the receptacle R-Ct value for experiment B and to the control G2-fruits-Ct for experiment C. G1: small-sized green fruits; G2: middle-sized green fruits; G3: full-sized green fruits; W: white fruits; R: full-ripe red fruits.

Table S4. Evaluation of the 8-mer sequences recognized. Enrichment score (E-score) greater than 0.45—considered as high specific binding—all of them containing core sequence AAAG.

Table S5. The location of the A[A/T]AAAGT motifs of promoter sequences belonging to down-regulated genes in fruits where the *FaDOF2* expression was silenced by RNAi. A region of 2501 bases corresponding to the promoter region was obtained from the *Fragaria vesca* genome assembly v1.1 after locating the corresponding CDS regions using the blast service provided in NCBI MapViewer. The transcription factor bind consensus sequences were then mapped using bowtie2.

Table S6. Primer sequences. Fw: forward; Rv: reverse; Exp: used for qRT-PCR; RNAi: used for RNAi constructs; attb: used for pDONRTM221 constructs.

This file is available in full version only on CD rom version

Figure S1: The phylogenetic analysis and multiple sequence alignment of all the *DOF* genes in *Fragaria vesca*, tomato and *Arabidopsis*. FaDOF2 sequence from *Fragaria × ananassa* was included. The unrooted tree of all the *DOF* genes in three species was constructed from a complete alignment of 91 DOF proteins using the Clustal OMEGA method. Strawberry, tomato and *Arabidopsis* genes are indicated at the end of branches, respectively.

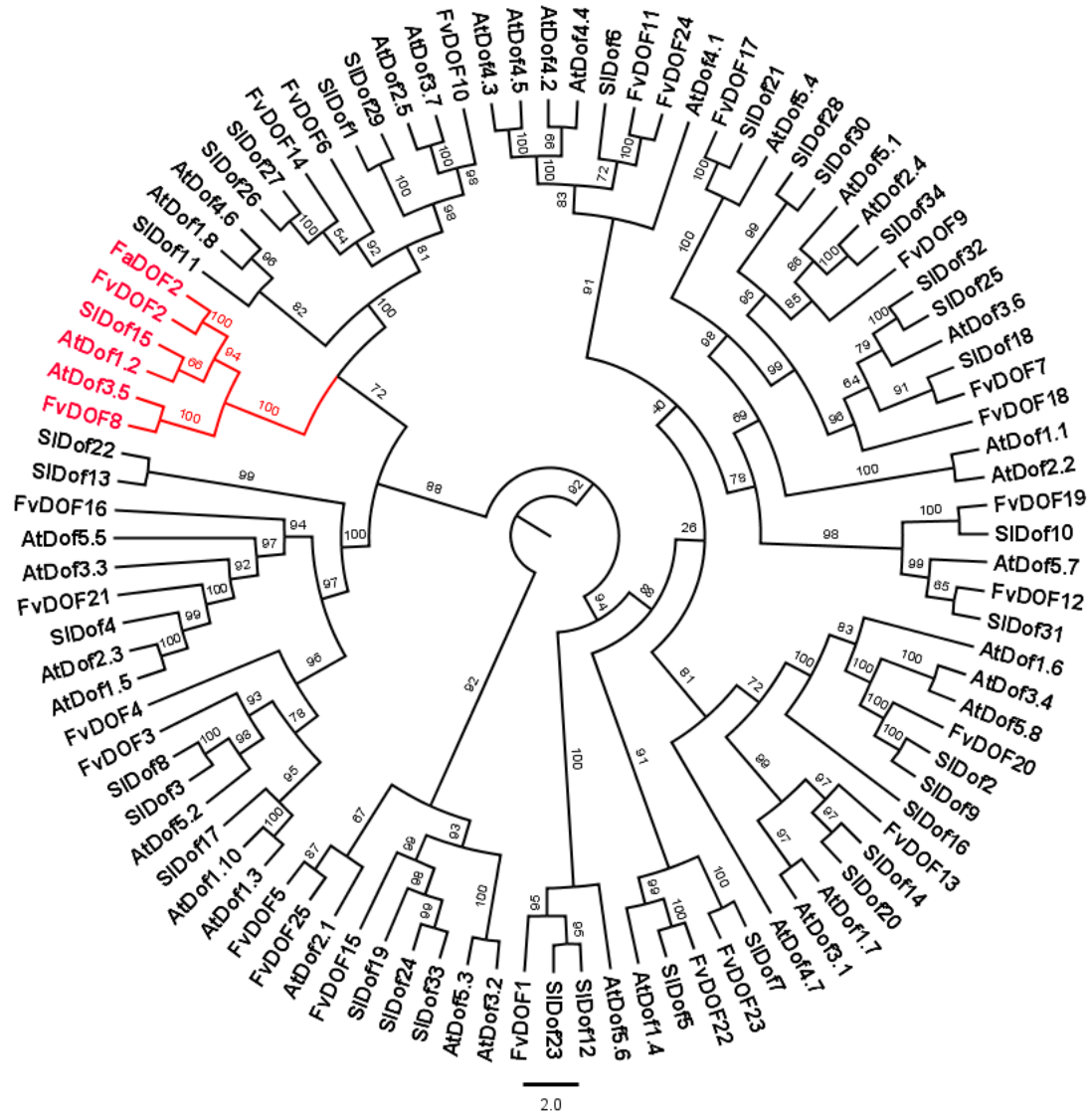


Figure S2: A. Predicted domain structure of FaDOF2. NLS, nuclear localization sequence. Numbers correspond to amino acid residues **B.** Alignment of the deduced amino acid sequence of FaDOF2 with other putative DOF proteins sequences. Identical amino acid residues are in black. Four conserved cysteine residues in the DoF domain are shown boxed. Asterisks show two aromatic residues (tyrosine and tryptophan) that are important for DNA binding. The bipartite NLS is indicated by B1 and B2. Accession numbers and sources for the respective sequences are FaDOF2 (*Fragaria × ananassa*, KP100112); FvDOF2 (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*, XP_004292540.1); Gmax (*Glycine max*, XP_003527971.1); Mdomestica (*Malus domestica*, XP_008339132.1); Mtrucacutula (*Medicago truncatula*, XP_003602157.1); Ppersica (*Prunus persica*, XP_0072004331.1); Ptrichocar (*Populus trichocarpa*, XP_002307484.2); Tcacao (*Theobroma cacao*, XP_007019428.1); Vvinifera (*Vitis vinifera*, XP_002262622.1). Sequences were aligned using GeneDoc 2.7.

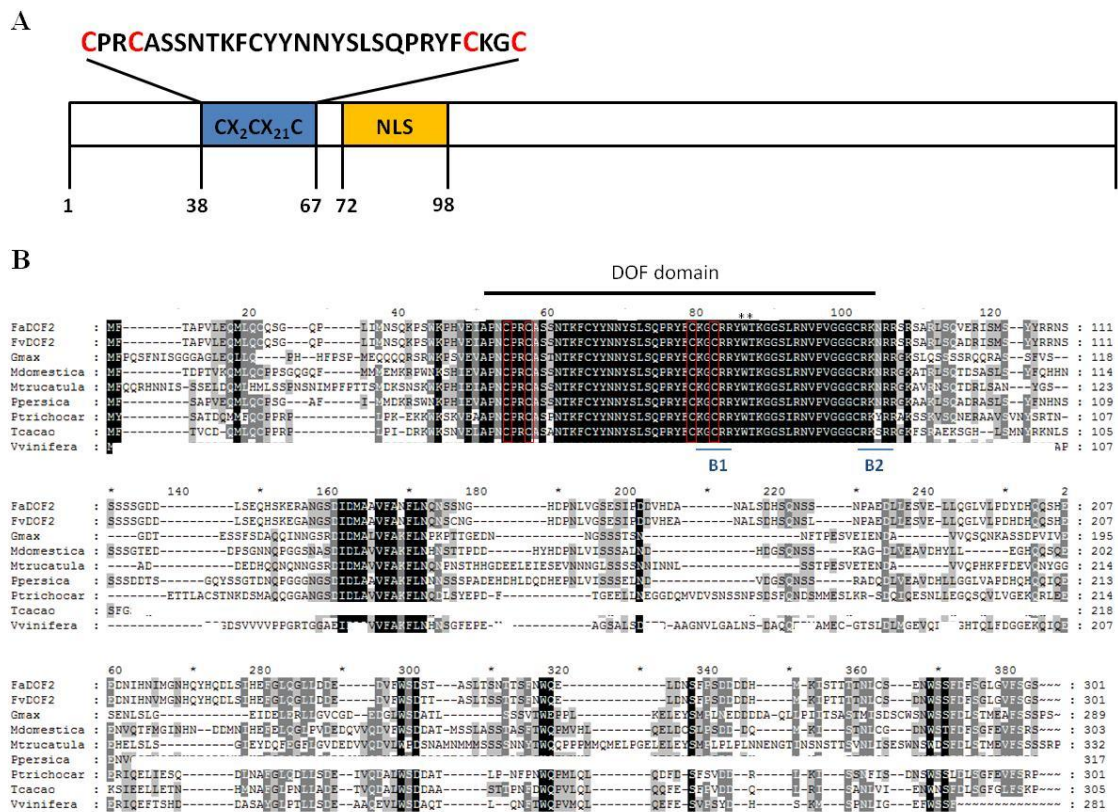


Figure S3: Screenshots corresponding to the FaDOF2 protein subcellular location prediction by (A) Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), (B) Wolfpsort (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) and (C) nuclear localization signal (NLS) prediction by NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>).

A

CELLO RESULTS

SeqID: FaDOF2

Analysis Report:
SVM

	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Nuclear	0.923
N-peptide Comp.	Nuclear	0.970
Partitioned seq. Comp.	Nuclear	0.827
Physico-chemical Comp.	Nuclear	0.536
Neighboring seq. Comp.	Nuclear	0.957

CELLO Prediction:

Nuclear	4.214 *
Extracellular	0.334
Cytoplasmic	0.173
Mitochondrial	0.065
PlasmaMembrane	0.063
ER	0.047
Chloroplast	0.032
Lysosomal	0.028
Vacuole	0.019
Golgi	0.013
Cytoskeletal	0.009
Peroxisomal	0.004

B



WoLF PSORT
Protein Subcellular Localization Prediction

Results:
testk used for kNN is: 14
FaDOF2 details nucl: 13

C

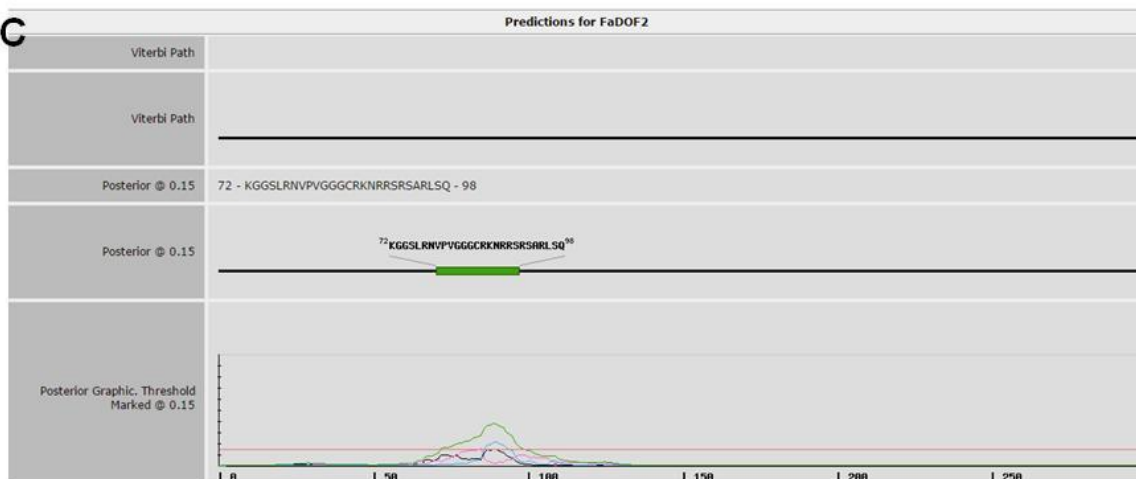


Figure S4: Spike-and-Recovery and linearity-of-dilution experiment done with Spike-in E1A. Graphic shows the relationship between the logarithm of the concentration of the Spike-in vs the signal obtained expressed in arbitrary units.

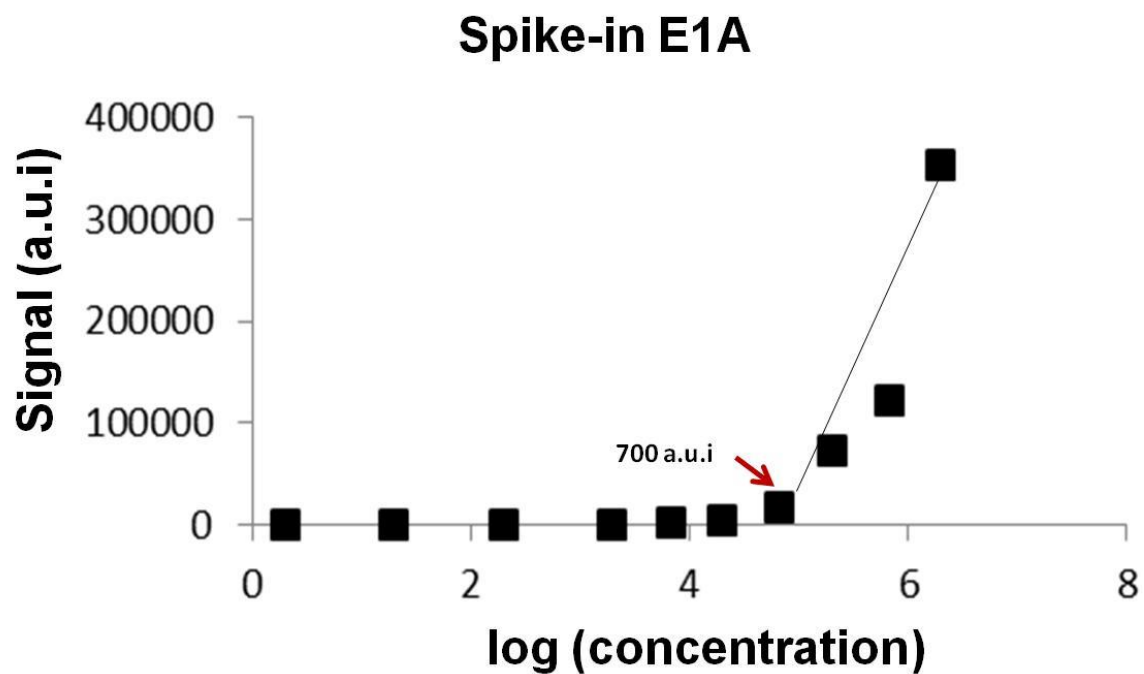


Figure S5: Developmental expression of the strawberry *FaEOBII* and *FaEGS2* in fruit receptacle of *F. × ananassa* cv. Camarosa variety. QRT-PCR results were obtained using specific primers. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Line represents GC-MS quantification of eugenol. Values are given in ng of eugenol per g of strawberry (ng g^{-1}) (Eugenol data also published in Medina-Puche et al., 2015). Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SN: senescent stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

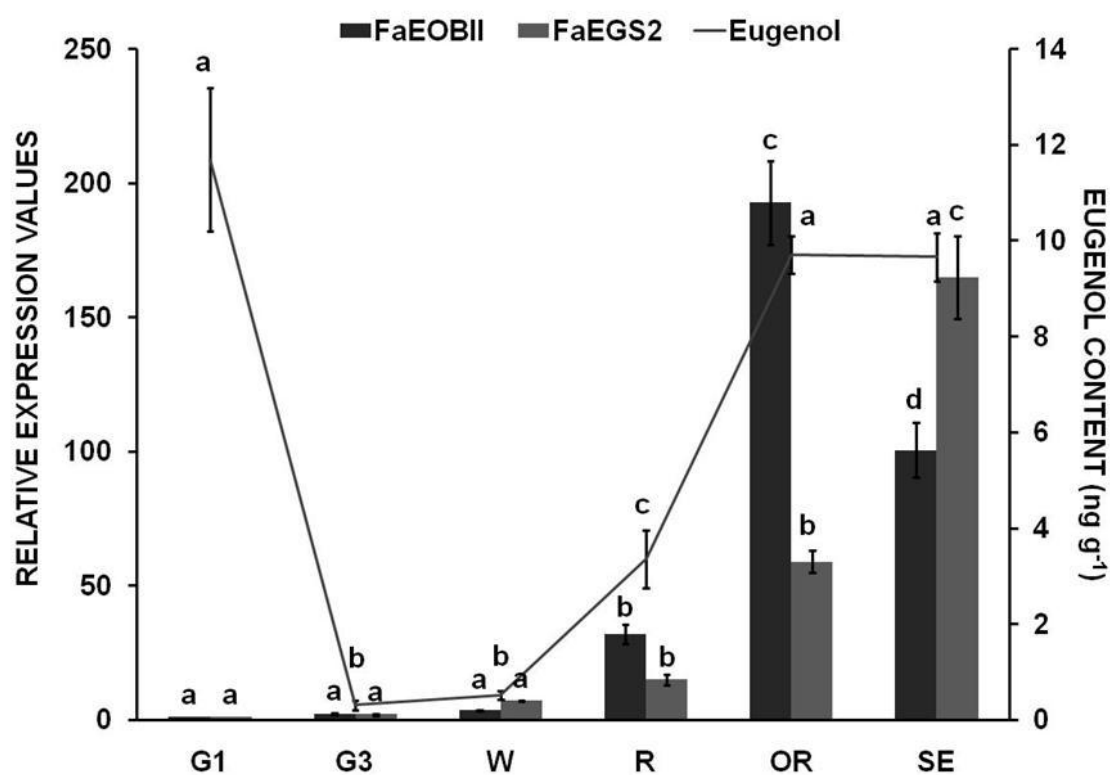


Figure S6: Expression of strawberry *FaDOF2*, *FaEOBII* and *FaEGS2* in petals of *F. × ananassa* cv. Camarosa variety. QRT-PCR results were obtained using specific primers. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle Rec Red-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Line represents GC-MS quantification of eugenol. Values are given in ng of eugenol per g of strawberry (ng g^{-1}). Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (***) p-value < 0.001.

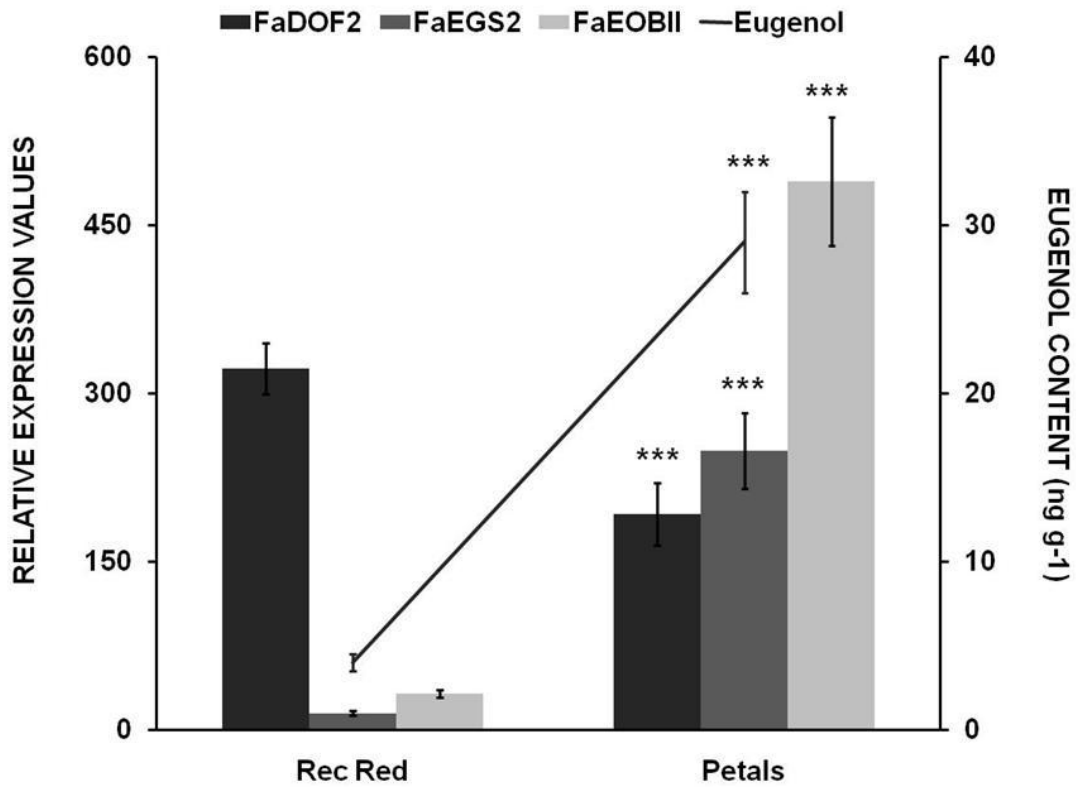


Figure S7: Developmental expression of the strawberry *FaODO1* and *FaEGS1* in fruit receptacle of *F. × ananassa* cv. Camarosa variety. QRT-PCR results were obtained using specific primers. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle SE-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SE: senescent stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

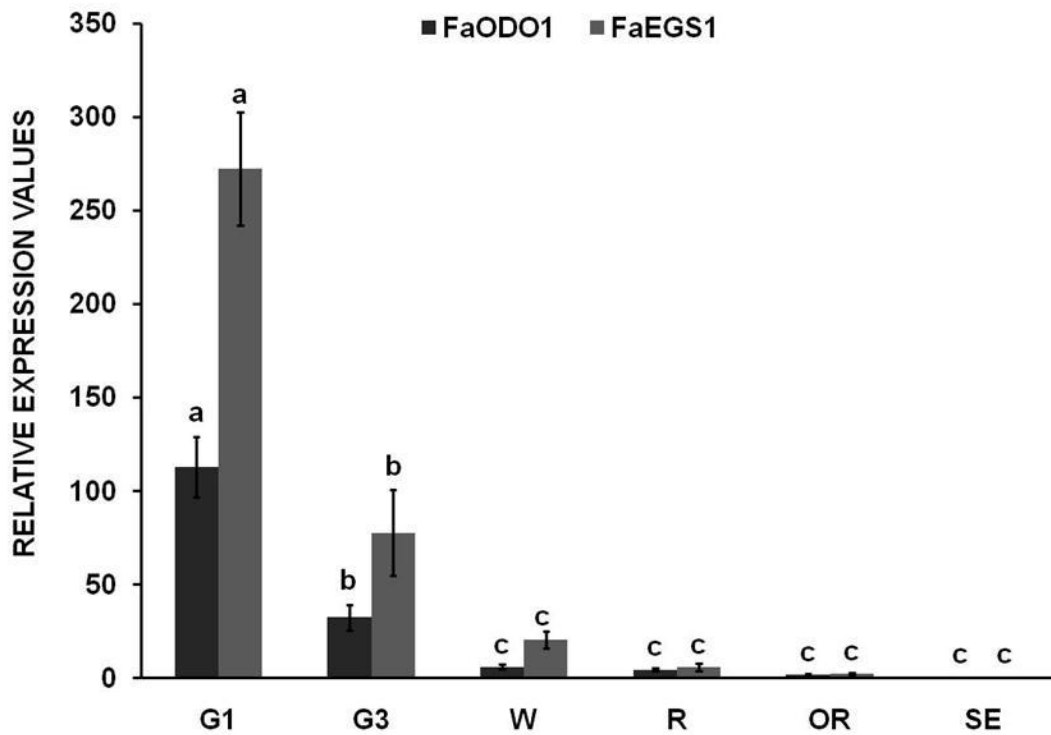


Figure S7: The regulatory network responsible for eugenol production in unripe and ripe strawberry fruit receptacle seems to be different.

As opposed to the *FaDOF2* expression, the expression of another putative fruit expressed *DOF TF*, *FaDOF1*, as well as a putative *FaODO1* TF gene (a R2R3 MYB TF) and a gene encoding a previously characterized eugenol synthase (*FaEGS1*; Aragüez et al., 2013) drastically decreased during unripe receptacle fruit growth stages. This decrease was accompanied by a strong decrease in eugenol content (Figure S5, S6 and S7). Co-regulation of the expression of these three genes suggests these two TFs, *FaDOF1* and *FaODO1*, are involved in the regulation of eugenol production in green unripe receptacles.

Interestingly, it was previously reported that the eugenol content in achenes of small green unripe strawberry fruits is very high and is mainly biosynthesized through the action of *FaEGS1* (Aragüez et al., 2013). However, our results have shown that *FaEGS1* is also expressed in green unripe receptacle where it could contribute to eugenol biosynthesis, in high amounts, in this fruit tissue. The *FaEGS1* gene expression could be regulated by the action of *FaODO1* and *FaDOF2* transcription factors.

While expression of *FaEGS2* is regulated by the concerted action of *FaEOBII* (a R2R3 MYB TF) and *FaDOF2* transcription factors in ripe receptacles, our results suggest that both *FaODO1* and *FaDOF1* transcription factors would regulate expression of *FaEGS1*, in green unripe receptacles and hence eugenol biosynthesis.

This regulatory network is quite different from that described in *Petunia hybrida* petals, where three R2R3 MYB TFs, named *PhEOBII*, *ODO1* (ODORANT1) and *EOBI*, regulate the expression of the structural genes related with eugenol biosynthesis (Verdonk et al., 2005; Schuurink et al., 2006; Spitzer-Rimon et al., 2010; Van Moerkercke et al., 2011; Spitzer-Rimon et al., 2012).

Figure S8: Developmental expression of the strawberry *FaDOF1* in fruit receptacle and achenes of *F. × ananassa* cv. Camarosa. QRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaDOF1* gene. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value in all experiments, which was assigned an arbitrary value equal to 100. Mean values ± SD of five independent experiments are shown. G1: small-sized green fruit; G3: full-sized green fruit (both stages of development); W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SE: senescent stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

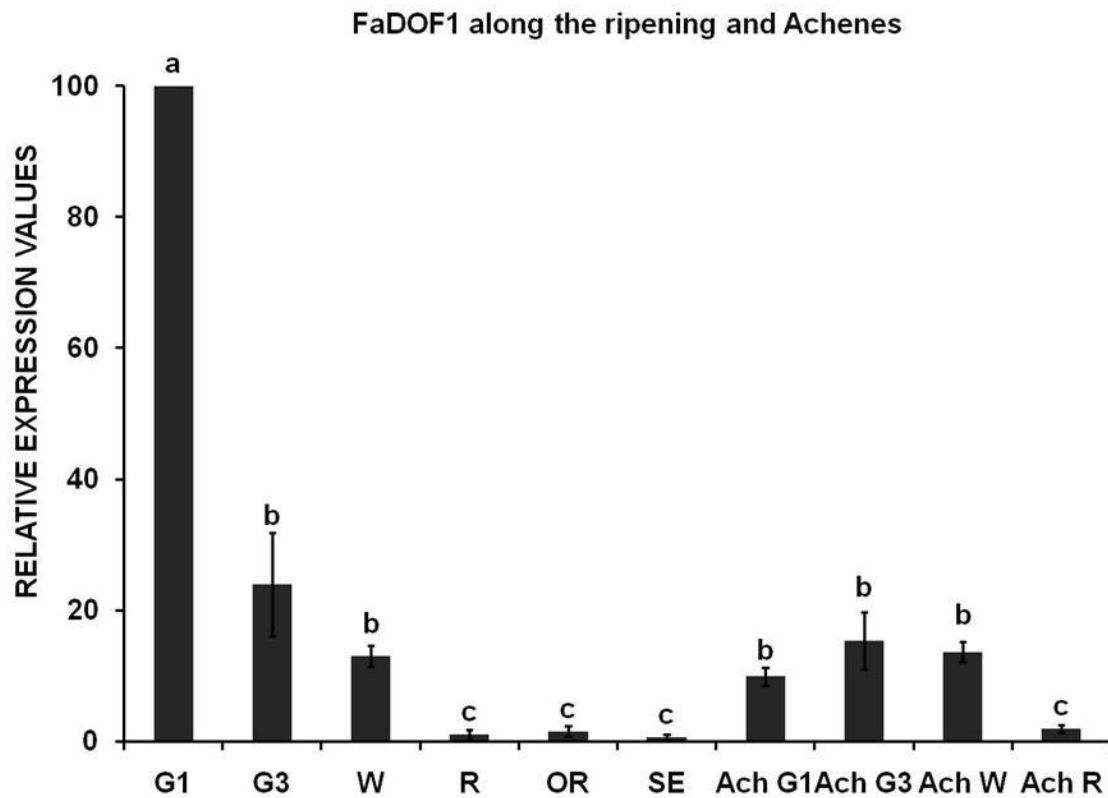


Figure S9: Expression of the strawberry *FaODO1*, *FaEGS1*, *FaEGS2* and *FaEOBII* in achenes vs green 1 and red receptacles. The cultivar used was *F. × ananassa* cv. Camarosa. QRT-PCR results were obtained using specific primers. Quantification is based on Ct values. The increase in the mRNA value was relative to the Ct value of each situation, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values \pm SD of five independent experiments are shown. Rec G1: receptacle G1; Rec R: receptacle R. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ($p < 0.05$, Scheffe post-hoc test).

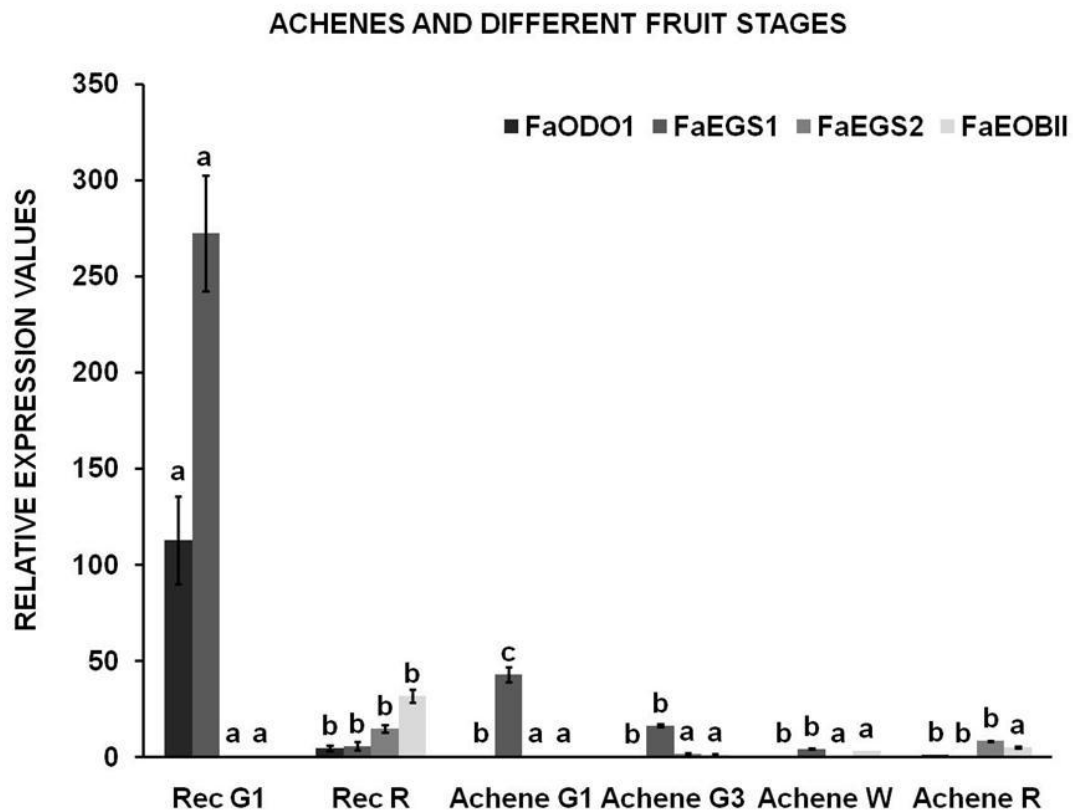
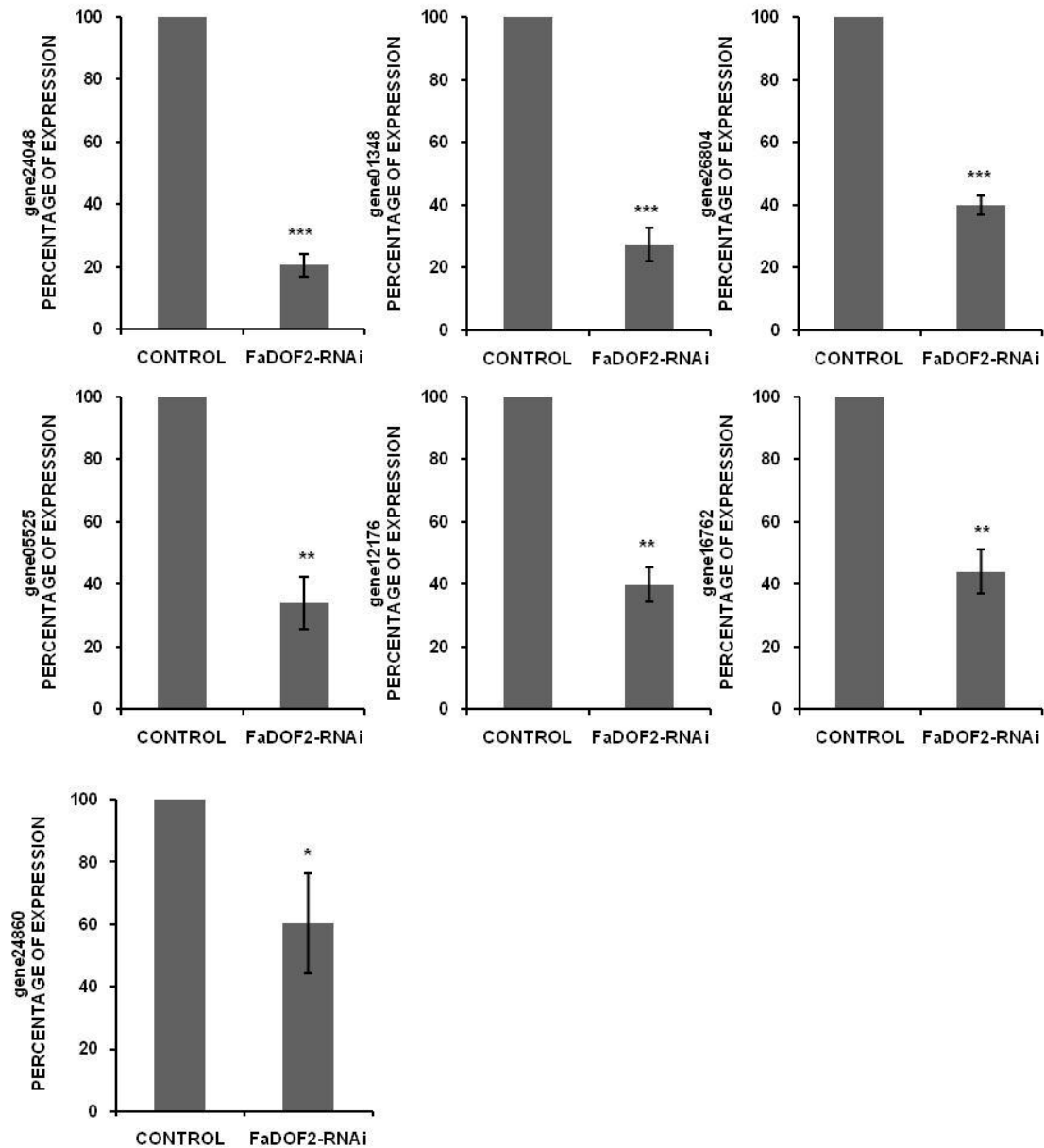


Figure S10: Validation of microarray data. Analysis by qRT-PCR of gene expression (Table 1) in fruits agroinfiltrated with the *FaDOF2*-RNAi construct and control fruits, infiltrated with empty pFRN vector. The cultivar used was *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta. Mean values ± SD of five independent experiments are shown. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (***) *p*-value < 0.001; (**) *p*-value < 0.01; (*) *p*-value < 0.05.



CHAPTER 4

Table S1. Total Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector and No Agroinfiltrated Fruits. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics 43, 109-116).

Table S2. Primer sequences. Fw: forward; Rv: reverse; Exp: used for qRT-PCR; RNAi: used for RNAi constructs; attb: used for pDONRTM221 constructs.

Table S3. Major characteristic of FaBOP1, NtBOP2, AtBOP1 and AtBOP2 proteins. PI and Mw were calculated using Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Subcellular location was predicted by Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw>).

Table S4. Microarray data from transcriptomic comparison between transgenic transiently-silenced FaBOP1 fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2011).

Table S5. Total Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Transiently-Silenced FaBOP1 Fruits and Control Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev et al., 2010. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics 43, 109-116).

This file is available in full version only on CD rom version

Figure S1. Spike-and-Recovery and linearity-of-dilution experiment done with Spike-in E1A. Graphic shows the relationship between the logarithm of the concentration of the Spike-in vs the signal obtained expressed in arbitrary units.

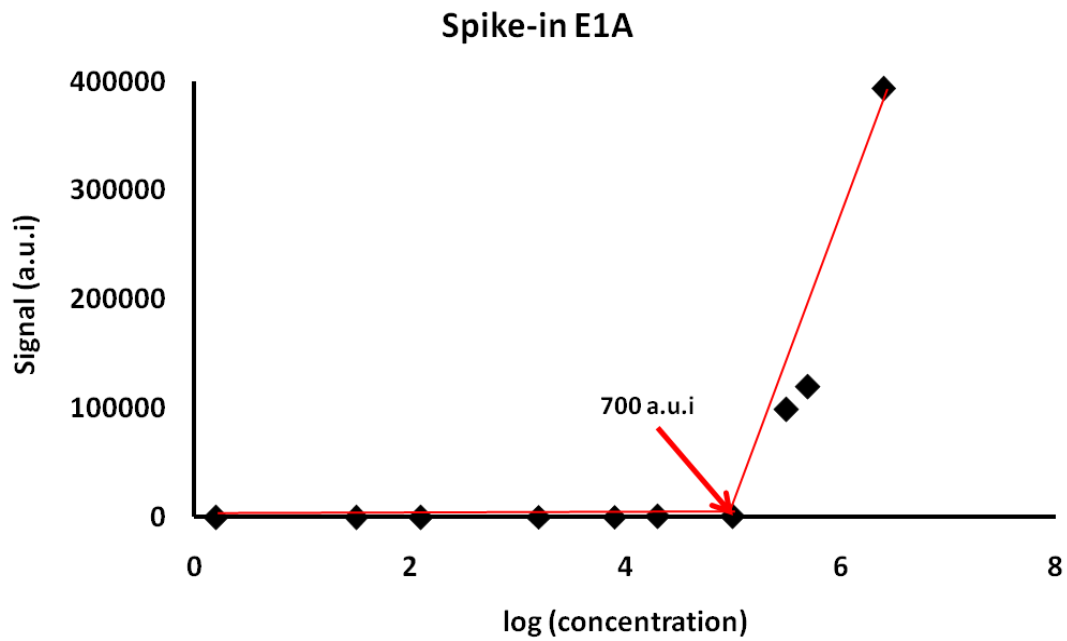


Figure S2. Validation of microarray data. Analysis by qRT-PCR of gene expression in fruits agroinfiltrated with the *FaBOPI*-RNAi construct and control fruits, infiltrated with empty pFRN vector. The cultivar used was *Fragaria* × *ananassa* cv. Elsanta.

<i>gene ID</i>	<i>Microarray</i> <i>fold-change</i>	<i>qRT-PCR</i> <i>fold-change</i>	<i>Annotation</i>
gene06191	-41.072	8.125 down	Beta-1,4-glucanase (Cel1)
gene09603	-16.711	5.042 down	4-Coumarate-CoaA ligase 7
gene09753	-29.911	8.045 down	Phenylalanine ammonia-lyase 2
gene15845	-5.855	3.782 down	Cinnamoyl CoA reductase 1 (CCR1)
gene23261	-4.686	3.197 down	Phenylalanine ammonia- lyase 6
gene25060	-13.970	6.679 down	MYB transcription factor 10
gene26030	-110.716	14.426 down	Expansin 3 (Exp3)
gene26825	-71.096	12.341 down	Chalcone synthase (FrCHS5)
gene26826	-70.793	10.985 down	Chalcone synthase (FrCHS2)
gene28093	-13.238	3.839 down	Cinnamate-4-hydroxylase
gene29483	-24.587	5.572 down	Cinnamoyl CoA reductase 2 (CCR2)
gene34259	-32.058	8.643 down	Beta-1,4-glucanase (FaEG1)

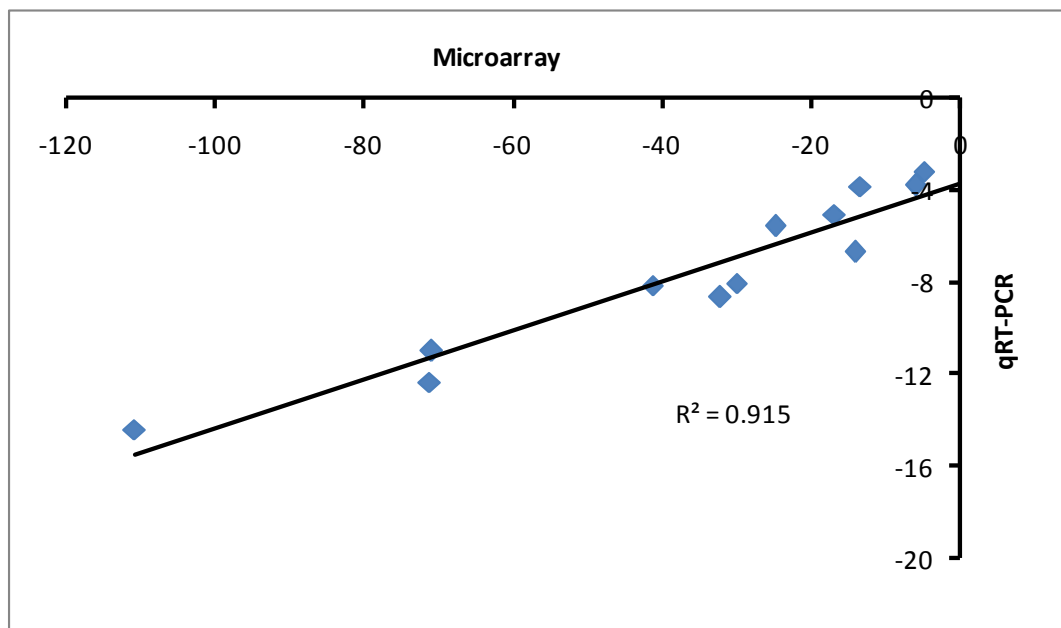


Figure S3. PCA analysis of metabolomic changes after the silencing of the *FaBOPI* gene. It is shown data of every one of the 4 biological replicates done in the experiment. Arrows indicate the magnitude and the direction of variation found in the different metabolites.

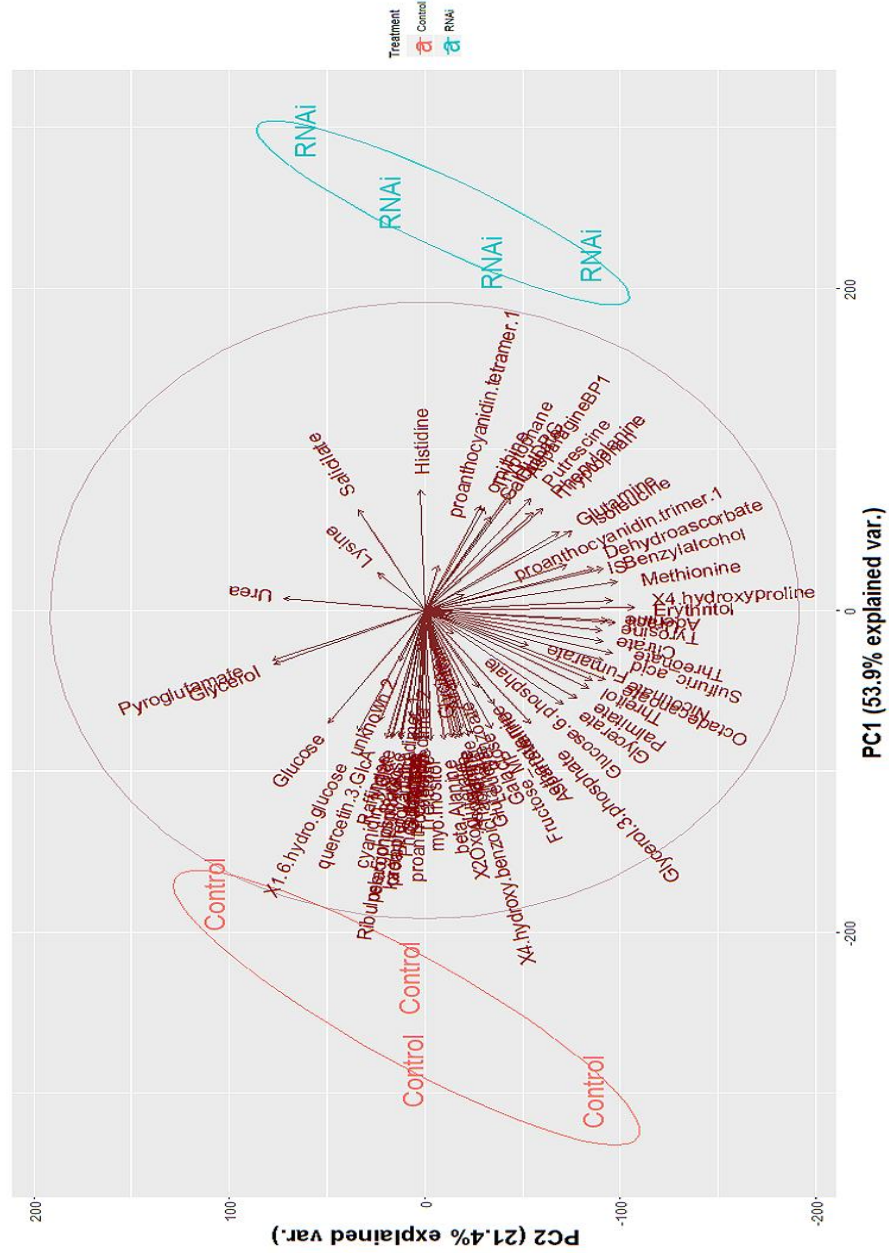


Figure S4. Correlation heatmap of metabolomic changes between control and *FaBOP1*-RNAi fruit receptacles.

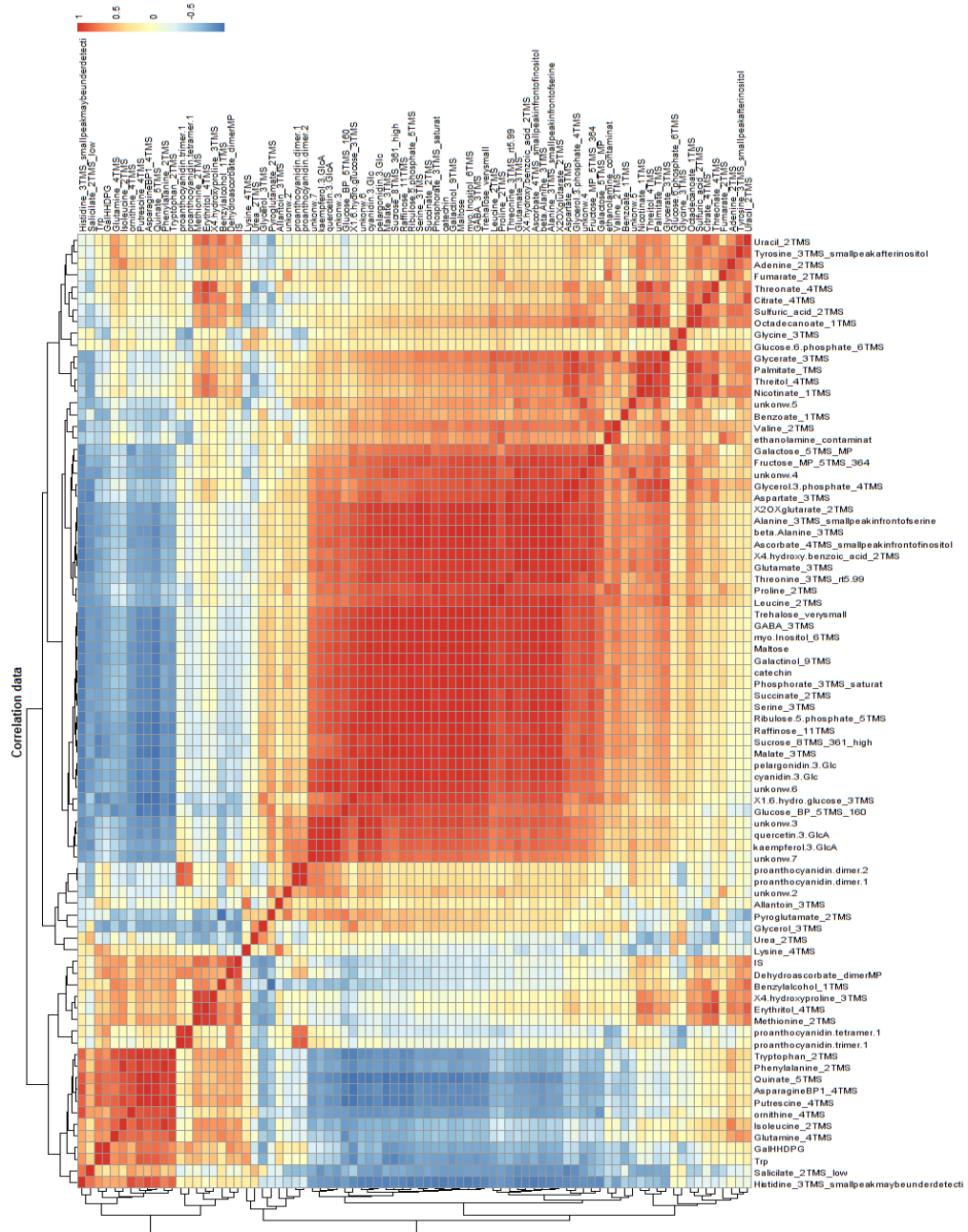


Figure S5. Analysis of primary and secondary metabolites by GC/MS and LC/MS of *FaBOPI*-RNAi fruit (grey) versus control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector (black). Mean values \pm SD of four independent extractions are shown. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test. (*) *p*-value < 0.001.

