



TÍTULO

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD NATURAL EN LA REGIÓN
PROMOTORA DEL GEN CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4
(CCD4)-B EN FRAGARIA spp.**

**ANALYSIS OF NATURAL VARIABILITY IN THE PROMOTER REGION
OF THE CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 (CCD4)-B GENE
IN FRAGARIA spp.**

AUTORA

Paula Sánchez Mediero

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2023
Tutoras	Dra. D ^a . Cristina Castillejo Mangado ; Dra. D ^a . Iraida Amaya Saavedra
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Málaga
Curso	<i>Máster en Biotecnología Avanzada (2021-22).</i>
©	Paula Sánchez Mediero
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2022



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD NATURAL EN LA
REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *CAROTENOID CLEAVAGE*
DIOXYGENASE 4 (CCD4)-B EN *FRAGARIA* spp.

ANALYSIS OF NATURAL VARIABILITY IN THE
PROMOTER REGION OF THE *CAROTENOID CLEAVAGE*
DIOXYGENASE 4 (CCD4)-B GENE IN *FRAGARIA* spp.

Autora: Paula Sánchez Mediero

Co-tutora-1: Iraida Amaya Saavedra

Co-tutora-2: Cristina Castillejo Mangado

Máster Biotecnología Avanzada
Curso 2021-2022
Universidad de Málaga



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

D./Dña. Paula Sánchez Mediero, con DNI (NIE o pasaporte)

DECLARA que es autor del presente Trabajo de Fin de Máster, titulado:

Análisis de la variabilidad natural en la región promotora del gen *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 (CCD4)-B* en *Fragaria* spp.

Que ha cumplido con las obligaciones legales sobre la propiedad intelectual e industrial y que además es un trabajo original, no habiéndose utilizado fuentes bibliográficas sin ser citadas debidamente. De no cumplir con este compromiso, el abajo firmante es consciente de que, de acuerdo con la Normativa de Evaluación y de Calificación de los estudiantes de la Universidad de Málaga de 14 de marzo de 2018, esto conllevará automáticamente la calificación numérica de cero, independientemente del resto de las calificaciones que hubiera obtenido. Esta consecuencia debe entenderse sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que se pudieran incurrir. En Málaga, a 26 de septiembre de 2022.

Fdo.

RESUMEN

La fresa cultivada, *Fragaria x ananassa*, es una especie octoploide que proviene de la hibridación de dos especies octoploides silvestres (*F. chiloensis* y *F. virginiana*). Las fresas son cultivadas en todo el mundo debido a que su fruto es muy apreciado por su olor, aroma, textura y sabor, además estos frutos tienen grandes beneficios para la salud. El color de la fresa es una cualidad muy importante para los consumidores, y aquí la mejora genética juega un papel imprescindible mediante la selección de fenotipos de interés. En el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, se comenzó a estudiar la variación interna de color amarillo/blanco del fruto de la fresa. La enzima CCD4 escinde los carotenoides (responsables del color amarillo) a apocarotenoides, los cuales, por lo general, no proporcionan ninguna coloración. En la población de mapeo usada (SS x FcL) en estos estudios previos, se comprobó que la expresión del gen que codifica la enzima CCD4 en esta población, está regulada por una inserción en el promotor de este. En este trabajo, se aborda el estudio de la secuencia del promotor del gen *FcCCD4-B*, de varias accesiones de la especie *F. chiloensis*. Para ello se ha amplificado, clonado y secuenciado el promotor del gen de diferentes accesiones y cultivares. A lo largo del trabajo se muestran las diferencias entre las secuencias. Así, se ha podido concluir que la expresión del gen *FcCCD4-B* puede estar ligada tanto a la presencia o ausencia de una inserción en la secuencia del promotor como a otras mutaciones encontradas. Estas mutaciones encontradas que son en su mayoría SNPs, pueden tener una gran repercusión en el desarrollo de nuevos marcadores moleculares en fresa los cuales son muy importantes y cada vez más utilizados para la mejora.

Palabras clave: *Fragaria*, CCD4, *FcCCD4-B*, carotenoides, apocarotenoides, color.

ABSTRACT

The cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa*, is an octoploid species that comes from the hybridisation of two wild octoploid species (*F. chiloensis* and *F. virginiana*). Strawberries are cultivated all over the world because their fruit is highly appreciated for its smell, aroma, texture and taste, and they also have great health benefits. Strawberry colour is a very important quality for consumers, and here genetic improvement plays an

essential role through the selection of phenotypes of interest. In the Strawberry Breeding and Biotechnology Laboratory of IFAPA in Malaga, the internal yellow/white colour variation of the strawberry fruit was studied. The CCD4 enzyme cleaves carotenoids (responsible for the yellow colour) to apocarotenoids, which usually do not provide any colouring. In the mapping population used (SS x FcL) in these previous studies, the expression of the gene encoding the CCD4 enzyme in this population was found to be regulated by an insertion in the *CCD4* promoter. In this work, we study the sequence of the promoter of the *FcCCD4-B* gene in several accessions of the species *F. chiloensis*. For this purpose, the gene promoter of different accessions and cultivars has been amplified, cloned and sequenced. The differences between the sequences are shown throughout the work. Thus, it has been possible to conclude that the expression of the *FcCCD4-B* gene can be linked to the presence or absence of an insertion in the promoter sequence as well as to other mutations found. These mutations found, which are mostly SNPs, can have a great impact on the development of new molecular markers in strawberry, which are very important and increasingly used for breeding.

Keywords: *Fragaria*, CCD4, *FcCCD4-B*, carotenoids, apocarotenoids, colour.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA FRESA	1
1.2. BENEFICIOS DE LA FRESA	2
1.3. MEJORA GENÉTICA DE FRESA	4
1.4. MARCADORES MOLECULARES	5
1.5. ANTECEDENTES DEL PROYECTO	5
1.6. IMPORTANCIA DE LOS CAROTENOIDES	8
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	10
3.2. DISEÑO DE CEBADORES.....	12
3.3. PCR DE LAS DISTINTAS ACCESIONES.....	12
3.4. LIGACIÓN	13
3.5. TRANSFORMACIÓN EN E. COLI	14
3.6. PCR DE COLONIA	14
3.7. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO	15
3.8. DIGESTIÓN	16
3.9. SECUENCIACIÓN.....	16
3.10. ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
- Análisis de la variabilidad en los promotores del gen FcCCD4-B.....	16
- Clonaje de la región promotora del gen FcCCD4-B.....	20
- USA1.....	22
- SS.....	23
- USA2.....	24
- 285.....	25
- 159.....	27
- 595.....	27
- 197.....	30
- 156.....	31
- Análisis de las secuencias promotoras del gen FcCCD4-B en las accesiones de Fragaria chiloensis	32

5. CONCLUSIÓN.....	38
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	38
- Utilidad de los SNPs encontrados para el desarrollo de marcadores moleculares ..	38
- Posibles repercusiones en la expresión de FcCCD4-B.	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA FRESA

Las fresas pertenecen al género *Fragaria*, integrante de la familia *Rosaceae*. La taxonomía actual de *Fragaria* incluye 20 especies silvestres nombradas, tres especies híbridas naturales descritas y dos especies híbridas cultivadas importantes para el comercio (Hummer et al., 2011). Son plantas perennes, herbáceas, polinizadas por insectos, de bajo crecimiento y capaces de reproducirse clonalmente. Las hojas suelen ser siempre verdes y trifoliadas principalmente. Por otro lado, las flores son siempre actinomorfas y generalmente blancas con cinco pétalos. Los frutos botánicos de este género son aquenios secos que se encuentran incrustados en un receptáculo carnoso (Liston et al., 2014).

Fragaria x ananassa (Figura 1) es una fresa cultivada, comercial, octoploide que surgió de la hibridación de dos especies octoploides silvestres. Estas dos especies octoploides, *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*, provienen de la fusión de los genomas de cuatro especies diploides. Las especies de *Fragaria* existen como una serie poliploide natural desde diploide hasta decaploide. Es muy importante la existencia de un genoma de referencia de alta calidad tanto para poder usar la fresa tanto como especie modelo como para identificar genes de importancia. En la investigación en fresa supuso un hito la publicación del genoma completo de la especie octoploide *F. x ananassa* cultivar Camarosa con resolución a nivel de subgenoma. Su ensamblaje fue un gran reto debido a su alto nivel de heterocigosidad (Edger et al., 2019). En las especies poliploides, uno de los subgenomas, que se le designa normalmente como 'dominante', posee un contenido de genes significativamente mayor y que se expresan en una mayor medida que en los otros subgenomas. En el caso de fresa, por ejemplo, el genoma dominante proviene del ancestro diploide *F. vesca*. (Edger et al., 2019).



Figura 1: *Fragaria x ananassa*. De izquierda a derecha: hojas trifoliadas, fruto y flor. Imágenes recuperadas de: <https://www.gbif.org/>.

1.2. BENEFICIOS DE LA FRESA

Las bayas son una de las categorías de alimentos más importantes y contienen muchos compuestos nutritivos. En el mundo de las bayas, las fresas son las más populares y disponibles en el mundo durante todo el año (Zambon et al., 2022). La fresa se cultiva en todo el mundo porque su fruto es muy apreciado por su aroma característico, su color, su textura y su sabor (Trejo-Téllez & Gómez-Merino, 2014). Aunque se valoran principalmente por su sabor, las fresas también tienen beneficios potenciales para la salud (Liston et al., 2014).

Las fresas contienen altos niveles de compuestos fenólicos y otros compuestos los cuales se sabe que proveen protección contra el daño por radicales libres, y han sido asociados con la disminución de la incidencia y mortalidad de diversos tipos de cánceres y enfermedades coronarias, además de un sin número de beneficios para la salud (Cárdenas-Navarro et al., 2019). Los estudios epidemiológicos han observado una asociación constante entre el consumo de dietas ricas en frutas y verduras y un menor riesgo de enfermedades crónicas. Cada vez hay más pruebas de que los beneficios de estos alimentos vegetales provienen de fitoquímicos, siendo los más abundantes en fresa, el ácido elágico y ciertos flavonoides (antocianina, catequina, quercina y kaempferol) (Hannum, 2010).

Los carotenoides son otros compuestos a los que se les atribuye beneficios importantes para la salud. Si bien hasta la fecha hay pocos estudios acerca de la importancia de la fresa como fuente de carotenoides, es una línea de trabajo abierta en el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, en el que se ha realizado el presente trabajo, y el gen objeto de estudio codifica para una enzima implicada en el catabolismo de los carotenoides, la Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4 (CCD4)-B.

Tanto los carotenoides como sus productos de escisión enzimática, los apocarotenoides, están asociados con procesos que tienen un impacto positivo en la salud humana (Rodríguez-Concepcion et al., 2018). Hace tiempo se viene postulando que los carotenoides actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune. Los carotenoides también tienen una gran actividad antioxidante que depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración *cis* o *trans*, etc.), su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E. También son considerados compuestos anticancerígenos, existiendo estudios que relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta. Varias investigaciones epidemiológicas han mostrado que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de vegetales y frutas ricos en carotenoides (Meléndez-Martínez et al., 2004). Además, algunos carotenoides tienen actividad como provitamina A. La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sanos la piel y los tejidos superficiales. Puede aportarse como tal vitamina, llamada retinol, como algunos análogos menos activos, o como sus precursores, los carotenoides. No todos los carotenoides son precursores de la vitamina A, por lo que podemos dividirlos en dos grandes grupos: provitamínicos y no provitamínicos (Meléndez-Martínez et al., 2004). Por otro lado, también ha sido demostrado que los apocarotenoides inhiben la proliferación de células cancerosas de mamíferos al alterar la expresión génica, entre otros beneficios que poseen estos compuestos resultantes de la degradación de los carotenoides. (Hou et al., 2016)

1.3. MEJORA GENÉTICA DE FRESA

La investigación sobre la genética y mejoramiento de la fresa es complicada debido a su genoma octoploide. Cada uno de los cuatro subgenomas proviene de un donante diploide pero en un estudio realizado por Edger et al., (2019) se obtuvo un genoma de referencia de alta calidad de *F. x ananassa* cultivar Camarosa.

La mejora genética sirve para dar respuesta tanto a los gustos de los consumidores como a las necesidades de los productores. Los esfuerzos de mejoramiento van cambiando la fresa para su producción comercial enfocada en características como el tamaño de la fruta, su forma, su color, su rendimiento, la resistencia a plagas, la vida postcosecha... La mejora genética vegetal se basa en una elección realizada por el hombre de las mejores plantas escogidas dentro de una población en la cual tiene que existir variabilidad (Uz-Zaman et al., 2018). Esto es importante ya que la utilización de la variación genética natural contribuye en gran medida a la mejora de características agronómicas importantes en los cultivos.

En Inglaterra, durante el siglo XIX se empezó el mejoramiento formal de fresas y sus cultivares se convirtieron en la base de muchos cultivares europeos modernos. Hoy en día, la fresa de postre, *F. x ananassa*, es el cultivo dominante en el mundo. Sin embargo, la demanda de nuevos cultivares va a ser necesaria para hacer frente al cambio climático y a la cantidad de consumo humano. También, es importante prestar atención a la apariencia de las fresas y mejorar su resistencia a las plagas. El cruzamiento se ha utilizado predominantemente para la mejora de fresas, seleccionándose plántulas con una combinación que se desea de caracteres. No obstante, la incorporación de todas las características en un mismo fruto no es tan fácil. Los marcadores moleculares han sido utilizados en fresa desde 1980, pero en los últimos años las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han aumentado la cantidad de datos genómicos de esta especie. Se quieren lograr diversos objetivos en lo que respecta al rendimiento, valores nutricionales, resistencia a diversas condiciones climáticas... Para lograr estos objetivos la investigación sobre la diversidad genética de la fresa es fundamental. Los programas de mejoramiento de fresa ayudan a evaluar la diversidad genética de las distintas accesiones de fresa (Uz-Zaman et al., 2018).

1.4. MARCADORES MOLECULARES

La obtención de nuevos cultivares para la mejora de fresa mediante la elección de las plantas por el hombre tarda más de 8-10 años y en ocasiones pasado este tiempo no se garantiza la obtención de ese cultivar mejorado. Esto es debido a que, por ejemplo, para ver el color del fruto de la fresa tenemos que esperar al crecimiento de esta. La selección asistida por marcadores (MAS) ofrece muchas ventajas al hacer más eficientes las estrategias de selección en los programas de mejora. Son herramientas muy poderosas para determinar las características genéticas de las plantas y seleccionar por el genotipo (Gil, 2011).

Un marcador genético es un polimorfismo heredable de forma mendeliana simple, cuya variabilidad puede ser detectada y estudiada en análisis genéticos. Dentro de estos, los marcadores moleculares se basan en polimorfismos en la secuencia de DNA, estos polimorfismos se distribuyen homogéneamente por todo el genoma y no están influenciados por el ambiente. Debido al hecho de que los marcadores moleculares son independientes de las condiciones ambientales y del estadio de desarrollo de la planta, el uso de estos proporciona varias ventajas respecto a la mejora clásica. Este método permite una selección temprana, disminuyendo los gastos del cultivo. Sustituciones en una sola posición, reordenamientos más grandes (inserciones o eliminaciones) o variaciones en las secuencias de ADN repetidas en tándem generan marcas o etiquetas que se pueden identificar y rastrear fácilmente por ensayos de visualización de ADN (Bonet, 2010).

Los marcadores moleculares se emplean ampliamente en la investigación y el cultivo de plantas. En los últimos años, los marcadores SNP han ganado mucho interés en la comunidad científica y de mejoramiento. Cada SNP de ADN es un marcador potencialmente útil (Ganal et al., 2009).

1.5. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Las frutas tienen una importancia vital en la dieta humana y la calidad de la fruta está determinada por una amplia gama de características deseables, como el valor nutricional,

la vida útil y el color de la piel de la fruta. El color de la piel de la fruta, es uno de los rasgos más importantes tanto para el valor comercial como estético de la fruta y está determinado principalmente por el contenido y la composición de antocianinas (Kayesh et al., 2013). En fresa, las antocianinas han sido ampliamente estudiadas, estas proporcionan al fruto desde un color rojo intenso hasta un color blanco (ausencia de antocianinas). En uno de los estudios en el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, se observó que algunas fresas tenían un color ligeramente amarillo en el interior mientras que otras eran completamente blancas. Por ello, se inició el estudio de esta variación de color en una población de mapeo (Figura 2).

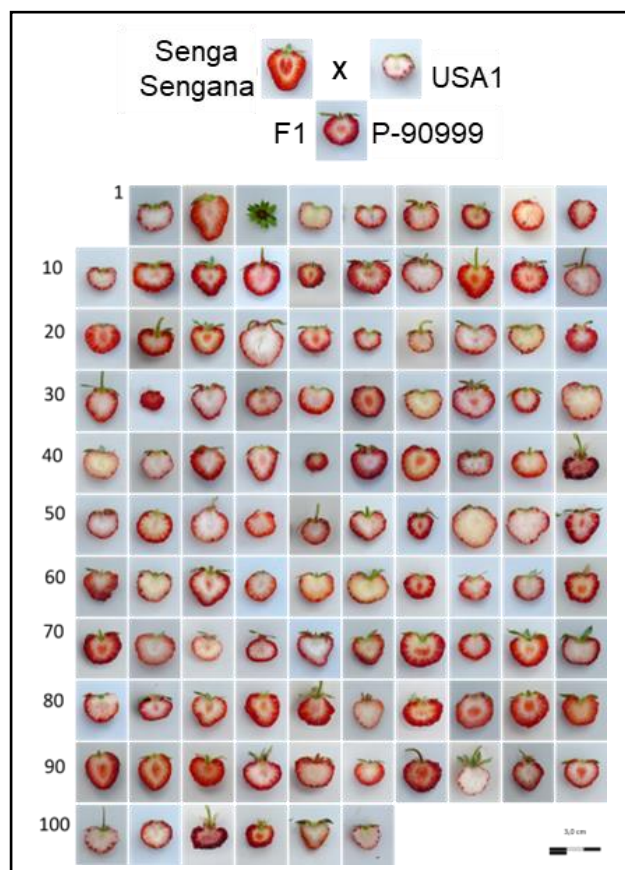


Figura 2: Población de mapeo utilizada en estudios previos en el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga. Los parentales son *Fragaria x ananassa* cultivar Senga sengana y *Fragaria chiloensis* ssp.lucida (SSxFcL). F1 es la primera generación después del cruce y F2 es el resultado de la autofecundación de F1.

Para este estudio, el primer paso fue la identificación de QTLs. Se identificó un único QTL que explica el 81,8% de la variación de color amarillo/blanco (variación Y/W) en la población (Figura 3). En el intervalo definido por el QTL hay un total de 241 predichos. Entre ellos, se incluía un gen que codifica para una *Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4* (*CCD4*), un enzima implicada en degradación de carotenoides, siendo por tanto un fuerte candidato a ser el responsable de la variación Y/W.

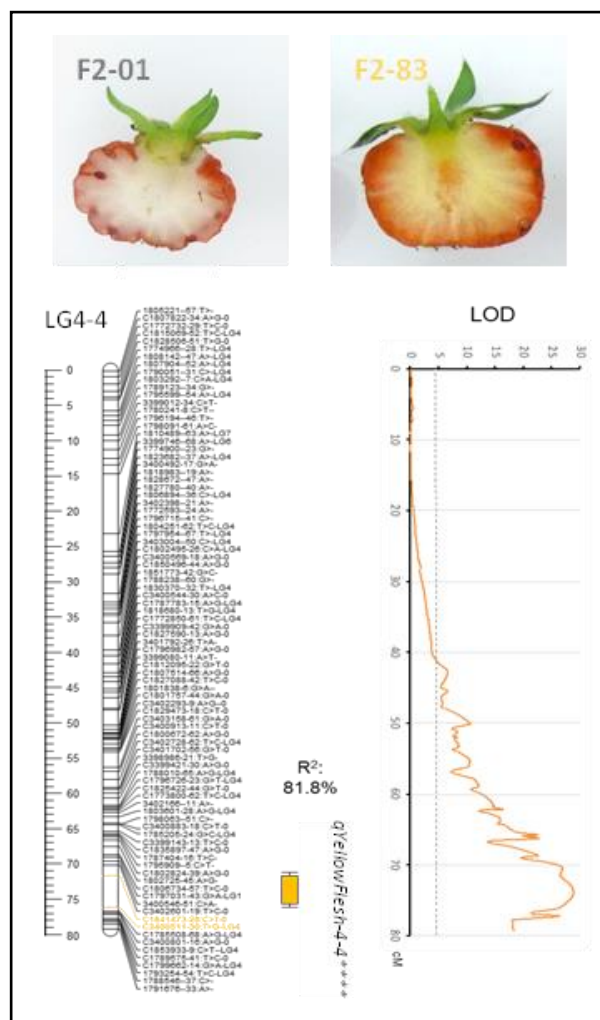


Figura 3: QTL que explica el 81,8 % de la variación Y/W en la población de mapeo.

Al estudiar la secuencia codificante de este gen no se encontraron polimorfismos, por lo que se procedió a estudiar la secuencia del promotor para analizar la existencia de polimorfismos en esta. Comprobaron mediante un análisis de PCR en la población de mapeo (Figura 4) y secuenciación de los promotores que las fresas con un color blanco

contienen una inserción de 432 pb en el promotor del gen *CCD4*. También, se comprobó que el gen *CCD4* no se expresa en los frutos amarillos de fresa. Por último, se realizó una cuantificación de carotenos en los individuos de esta población y éste reveló un mayor contenido de carotenoides en las fresas de frutos amarillos. Por lo tanto, se comprobó que la inserción de 432 pb en el promotor de *CCD4* esta correlacionada con un color blanco del fruto y con un menor contenido de carotenoides ya que la enzima CCD4 se encarga de degradar los carotenoides a apocarotenoides.

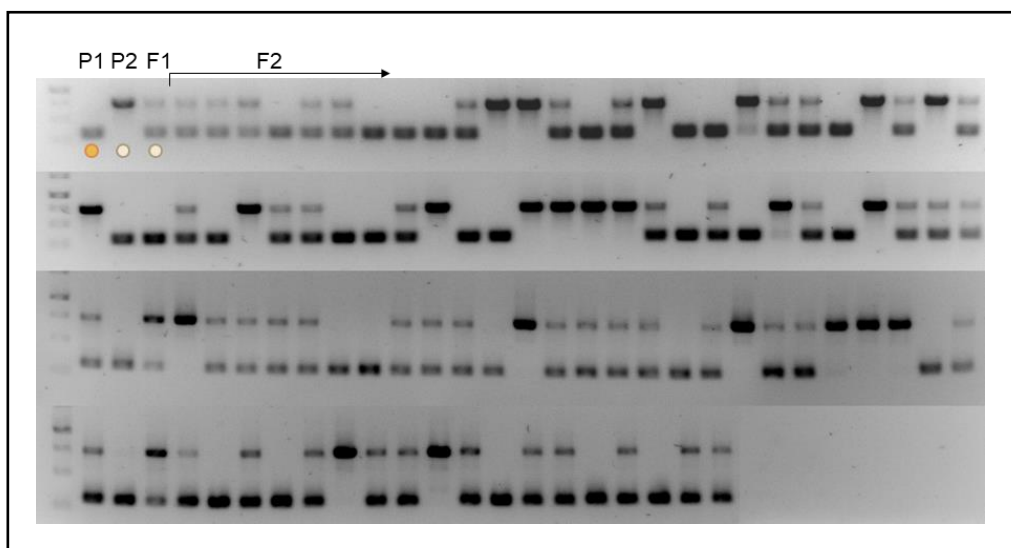


Figura 4: Resultado de la PCR para la amplificación del promotor del gen *CCD4* en los individuos de la población de mapeo. P1 corresponde con el parental *F. x ananassa* cultivar Senga sengana, como se puede ver el tamaño de la secuencia es pequeño ya que el promotor del gen no incluye la inserción responsable de la ausencia de color (Por lo tanto, el círculo naranja corresponde con un fenotipo de color amarillo). P2 corresponde con el otro parental USA1, en este caso el tamaño de la secuencia del promotor incluye la inserción responsable de la ausencia de color (Por lo tanto, el círculo de color claro corresponde con el fenotipo blanco). El resto de las muestras se corresponde con la F1 y la F2. Estos individuos pueden tener los dos tamaños de secuencia ya que pueden heredar ambos de los dos parentales.

1.6. IMPORTANCIA DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides son isoprenoides económicamente valiosos que son sintetizados por organismos fotosintéticos, algunos procariotas y hongos. Son tetraterpenoides que desempeñan variedad de funciones: pigmentación, producción de fitoquímicos como el ácido abscísico, la estrigolactona y otros apocarotenoides (Varghese et al., 2021). Los carotenoides son los responsables del color amarillo del maíz, del color naranja de la zanahoria, la calabaza y las naranjas, del color rojo del tomate... (Rodríguez-Concepcion

et al., 2018). En los frutos carnosos estos pigmentos se acumulan principalmente en los plastoglobulos dentro de los cromoplastos.

En la naturaleza se encuentran dos clases de carotenoides: los carotenos (como β -caroteno) y los derivados oxigenados de los carotenos (como la luteína, la violaxantina, la neoxantina...) que se denominan conjuntamente xantofilas. Los carotenoides actúan como pigmentos captadores de luz y además protegen contra el daño fotooxidativo. Asimismo, estas moléculas disipan el exceso de energía luminosa que conduce a la producción de apocarotenoides (Botella-Pavía & Rodríguez-Concepción, 2006).

Como ya ha sido mencionado los carotenoides pueden ser degradados. Unas de las enzimas que catalizan este proceso son las CCD4, las dioxigenasas 9-cis-epoxicarotenoides, pertenecientes a la familia de las enzimas CCD, que escinden simétricamente los dobles enlaces en las posiciones 9,10 de los sustratos y dan lugar a apocarotenoides C13 (Figura 5). La mayoría de las enzimas CCD4 están dirigidas a los plastos, que son el sitio principal de acumulación de carotenoides en flores y frutos.

En el género *Citrus*, que también ha sido estudiada esta cuestión, se ha demostrado que una alta acumulación de apocarotenoides C30 es responsable de la coloración roja de la piel. Sin embargo, esto es un caso excepcional, ya que en otros cultivos como por ejemplo el melocotón la degradación de carotenoides da lugar a apocarotenoides, metabolitos incoloros (Zheng et al., 2021). También se demostró, por ejemplo, en la patata, que la expresión de *CCD4* es mayor en los tubérculos de pulpa blanca que en los tubérculos de pulpa amarilla. Son conocidos más casos similares, por lo que se concluyó que el cambio de color como consecuencia de la degradación de carotenoides parece estar controlado por la enzima CCD4 (Wen et al., 2020). *CCD4* se ha estudiado en varias frutas por lo que es un candidato en la regulación de la pigmentación en las frutas (Varghese et al., 2021).

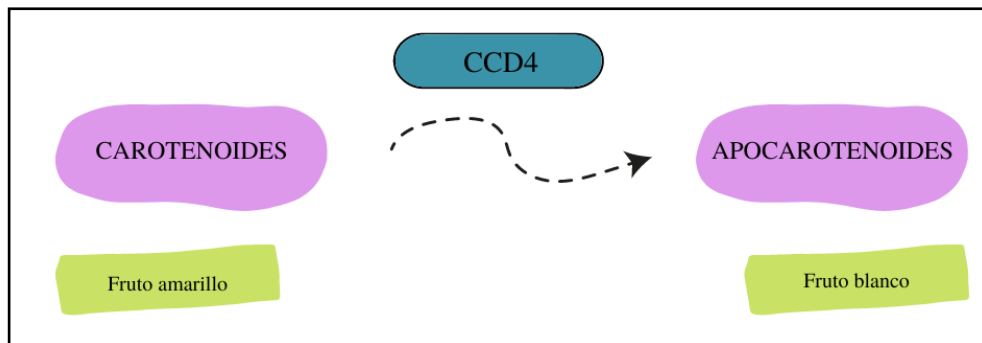


Figura 5: Esquema simplificado de la degradación de carotenoides a apocarotenoides mediada por el enzima CCD4.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es determinar la base genética de la variación natural del contenido de carotenoides en frutos de fresa y con ello la variación Y/W. En trabajos anteriores, en el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, se ha podido comprobar en la población SS x FcL que las enzimas CCD4 son las responsables del color blanco de la pulpa de la fresa. En este trabajo se quiere comprobar si esto ocurre fuera de esta población de mapeo.

Para poder llevar a cabo este objetivo específico se establecieron otra serie de objetivos:

- Clonar la secuencia del promotor del gen *FcCCD4-B* en una selección de genotipos de la especie *F. chiloensis*.
- Secuenciación de este promotor.
- Observar las diferencias entre las secuencias de este promotor entre las diferentes accesiones y cultivares, comparándolas entre ellas y con un genoma de referencia de *Fragaria x ananassa* cultivar Camarosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización de este trabajo se utilizó DNA genómico que, anteriormente, había sido aislado de todas las accesiones en las que se ha hecho el análisis genético de *CCD4*. En este trabajo han sido utilizados el DNA genómico de varias accesiones de *F. chiloensis*: USA1, USA2, 156, 157, 159, 160, 163, 197, 285 y 595. También han sido usados los DNA genómicos de los siguientes cultivares: *F. x ananassa* cultivar Senga sengana (SS), *F. x ananassa* cultivar Camarosa (Camarosa) y *F. x ananassa* cultivar Candonga (Candonga).

Ni el contenido en carotenos ni la variación Y/W es conocida de todas las accesiones y cultivares. El color interno del fruto de los parentales de la población de mapeo es conocido, USA1 posee un color interno blanco mientras que SS posee un color interno amarillo. Fuera de la población de mapeo se sabe que la accesión 285 tiene un color interno amarillo, por el contrario, la accesiones 156 y 163 poseen un color interno blanco. (Figura 6). En estas accesiones mencionadas podemos hablar del color porque se ve el fenotipo con claridad, pero esto no siempre es así, por ello lo más correcto es analizar el contenido de carotenos. En la población de mapeo este contenido fue analizado y se demostró que los frutos amarillos poseen un alto contenido en carotenos mientras que los frutos blancos poseen un menor contenido en carotenos.

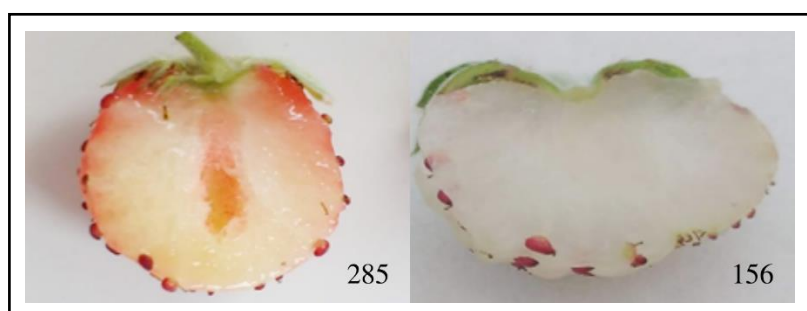


Figura 6: Color interno del fruto de las accesiones 285 y 156 de la especie *F. chiloensis*.

Previamente a todos los análisis genéticos, se midió la calidad y la concentración de este DNA utilizando el espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop™ One/One^C (Thermo Scientific™).

3.2. DISEÑO DE CEBADORES

Para el diseño de los cebadores de PCR, se partió de la secuencia de los 3 subgenomas homeólogos, en los que se encuentra el gen de interés, lo que permite diseñar los cebadores a usar con el fin de que solo se amplifique la secuencia del promotor de interés en el subgenoma B. El cebador sentido (ccm133) es específico del subgenoma B (Figura 7), en cambio, el cebador antisentido (ccm148) se une tanto al subgenoma B como al A (Figura 8). Sin embargo, para que ocurra la amplificación se necesita que se dé la unión de ambos cebadores, por lo tanto, solo se amplificará la secuencia del promotor para la cual los dos cebadores son específicos, es decir la secuencia del promotor *CCD4* del subgenoma B.

Cebador	Secuencia (5'-3')
Sentido	GTGGACCATTCCCCCTTTTC
Antisentido	ATGGCTGCTCTGGGTTGAG

Tabla 1: Secuencia de los cebadores usados para amplificar el promotor *FcCCD4-B*.

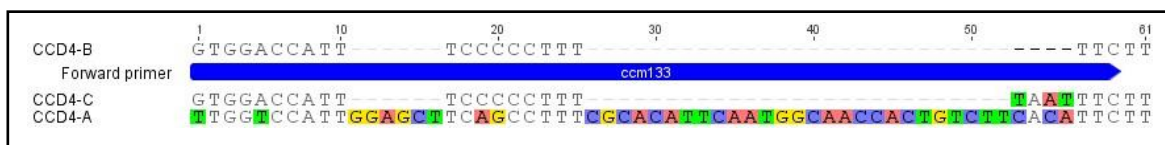


Figura 7: Cebador sentido cuya secuencia solo es complementaria con la secuencia del promotor del subgenoma B.

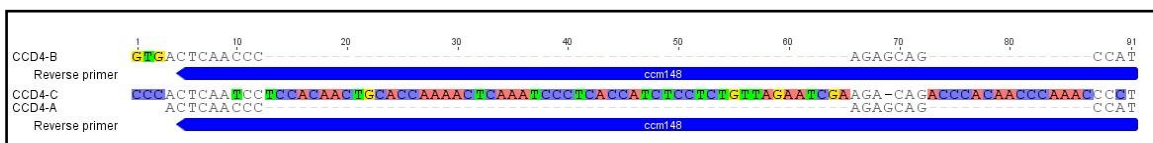


Figura 8: Cebador antisentido cuya secuencia es complementaria con la secuencia del promotor de los subgenomas A y B.

3.3. PCR DE LAS DISTINTAS ACCESIONES

La amplificación de las secuencias de los promotores se llevó a cabo con la ADN polimerasa GoTaq (Promega). Para llevar a cabo la PCR con la enzima GoTaq añadimos 0,075 µL de esta enzima, 3 µL de Buffer (5x), 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 µL de

desoxirribonucleótidos trifosfato (5Mm), 0,6 μ L de cada cebador (10 mM), 2 μ de cada DNA genómico y 6,925 μ L de agua destilada estéril hasta llegar a un volumen de 15 μ L. El programa que se usó para esta amplificación consistía en una desnaturalización a 95°C durante un tiempo de tres minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y por último la extensión final a una temperatura de 72°C durante 2 minutos. Con el fin de observar el tamaño del producto de PCR amplificado, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE1X y añadiendo RedSafe a una concentración final de 1X para su visualización.

Tras observar los resultados de esta PCR, se decidió llevar a cabo otra PCR con la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific™) en el caso de dos accesiones que aparentemente tienen un tamaño de secuencia diferente al resto. Para ello, usando las recomendaciones del fabricante, realizamos un volumen total de 20 μ L de PCR a amplificar para cada accesion. El programa que se usó para esta amplificación consistía en una desnaturalización a 98°C durante un tiempo de tres minutos, 35 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 65 °C durante 20 segundos, 72°C durante 1 minuto y, por último, la extensión final a una temperatura de 72°C. Al igual que en la PCR anterior, se realizó un gel de agarosa al 1% para poder llevar a cabo la electroforesis de los productos de PCR.

3.4. LIGACIÓN

Se realizó la ligación de ocho productos de PCR de las siguientes accesiones y cultivares: SS, USA1, USA2, 156, 159, 197, 285 y 595.

En este trabajo se llevó a cabo un método de clonaje mediante ligación en la cual no fue necesaria la purificación de los productos de PCR. El primer paso consiste en ligar el ADN de interés a un plásmido. Para esta ligación de productos de PCR se utilizó un método sencillo, el Kit Zero Blunt™ PCR cloning que utiliza vector multifunción de clonación pCR™-Blunt y la ligasa de ADN T4 ExpressLink™. Este vector (Figura 9) proporciona sitios donde van a poder cortar las enzimas de restricción EcoRI que se encuentran flanqueando los sitios de inserción del producto de PCR, de esta manera el producto de PCR de interés podrá insertarse en el vector con gran éxito. A cada tubo de ligación se añadió 8 μ L del mix de ligación (que contiene el vector, buffer y la ligasa T4)

junto con 2 μL del producto de la PCR. La reacción se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

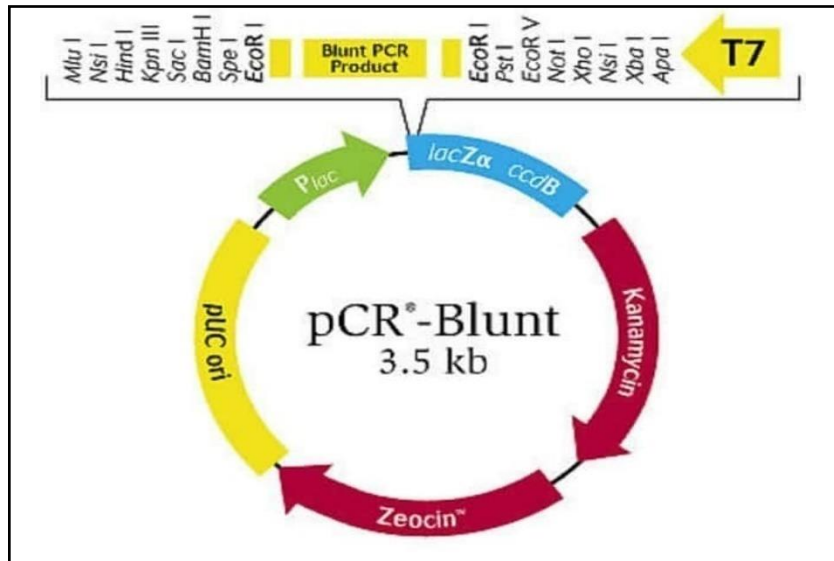


Figura 9: Vector pCR™-Blunt utilizado para la clonación del promotor del gen *CCD4-B* en este trabajo. Su tamaño es de 3500 pb y proporciona sitios de corte de EcoRI.

3.5. TRANSFORMACIÓN EN E. COLI

Se transformaron 5 μL de los 10 μL resultantes del producto de ligación en células competentes de *E. coli* TOP10. La transformación se llevó a cabo por choque térmico. Una vez realizada esta transformación, se sembró en placa de medio LB con el antibiótico kanamicina y se dejó incubar a una temperatura de 37°C toda la noche.

3.6. PCR DE COLONIA

La reacción se llevó a cabo con la ADN polimerasa GoTaq, añadiendo 8,85 μL de la mezcla de la colonia en agua, 0,15 μL de la enzima, 0,6 μL de los cebadores M13F (sentido) y M13R (antisentido) (a una concentración de 10 μM), 1,2 μL de MgCl_2 (25Mm), 0,6 μL de desoxirribonucleótidos trifosfato (5Mm), 3 μL del tampón de reacción (5x Green GoTaq) y agua destilada estéril hasta 20 μL . El programa utilizado para la reacción consistió en una desnaturalización inicial durante 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y medio

y acabo con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. El producto de esta PCR se observó mediante un gel de agarosa con las mismas características que el que ya han sido mencionadas.

3.7. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Las colonias positivas (colonias cuyo plásmido contiene el segmento de ADN de interés) por PCR se inoculan en medio líquido LB y se incuban una noche a 37 °C en agitación. Este cultivo se utilizó para la extracción y purificación del plásmido transformado, llevando a cabo una extracción de lisis alcalina que rompe las células del cultivo mediante un choque alcalino para poder seleccionar así el DNA plasmídico. El protocolo de la Miniprep alcalina sigue los siguientes pasos: Primero se centrifugaron 1,5 ml del cultivo a 7000 r.p.m durante dos minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió este paso. Una vez hecho esto se añaden 2 µL de RNasa (100 mg/ml) y 150 µL de la solución I (25mM Tris-HCL pH 7.5, 10mM EDTA pH 8), esta mezcla se resuspende con la pipeta. Después se añaden 150 µL de la solución II (40 µL NaOH 5N, 100 µL SDS 10%, 860 µL H₂O para 1 ml de solución II) y se mezcla por inversión. Seguidamente se añaden 180 µL de la solución III (60 ml de acetato potásico 5M, 11,5 ml de ácido acético. 28.5 ml H₂O) y se vuelve a mezclar cuidadosamente por inversión. A continuación, se centrifugan todas las muestras a 1300 r.p.m durante un tiempo de 7 minutos. Cuando ya se ha centrifugado se pasa el sobrenadante a un nuevo tubo al que se le añade 300 µL de isopropanol y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasados estos 5 minutos se vuelve a centrifugar 7 minutos a 1300 r.p.m y después de esto se quita de nuevo el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 70%. El siguiente paso es volver a centrifugar, pero esta vez a 7000 r.p.m durante 5 minutos. Una vez centrifugado hay que eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet resultante. Cuando este seco se resuspende en 50 µL de H₂O estéril para poder medir la concentración del DNA y la calidad de este en el nanodrop.

3.8. DIGESTIÓN

Se llevó a cabo una digestión del plásmido utilizando una enzima de restricción, EcoRI. Para la digestión se añaden 0,5 µL de la enzima EcoRI, 2 µL de Buffer (10x) y el plásmido purificado con una concentración entre 250 y 350 ng/ µL y por último se añadió agua hasta llegar a los 20 µL.

3.9. SECUENCIACIÓN

El producto final se secuenció a través del método de Sanger a través de una empresa externa (STAB-VIDA).

3.10. ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS

El resultado de la secuenciación que fue proporcionado por la empresa externa sirvió para realizar un ensamblaje de las secuencias de las diferentes accesiones y cultivares y para llevar a cabo un alineamiento de estas secuencias. Esto se realizó con el programa Geneious 7.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Análisis de la variabilidad en los promotores del gen FcCCD4-B.

Como ya ha sido explicado anteriormente, en algunos individuos de la población de mapeo se identificó una inserción en el promotor *CCD4-B*. Esta inserción se comprobó que estaba correlacionada con el color blanco del fruto de fresa y con un menor contenido de carotenoides (Figura 10). Tras estos hallazgos, en trabajos previos en el laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, se llegó a la conclusión de que esta inserción se correlaciona con niveles altos de expresión del gen *CCD4-B* cuya enzima es la encargada de la degradación de los carotenoides a apocarotenoides, responsables del color blanco del fruto.

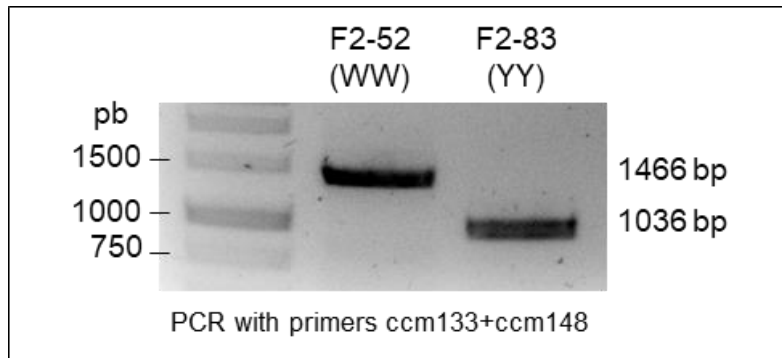


Figura 10: Comparativa del mayor tamaño de la secuencia del promotor *CCD4-B* en frutos blancos (WW) de fresa a causa de la inserción de 432 pb en comparación con frutos amarillos (YY). Esta comparativa se realizó con dos individuos de la F2 de la población de mapeo (F2-52 y F2-83). Se trata de un resultado obtenido en los estudios previos realizados en el laboratorio de Mejora y Biotecnología del IFAPA de Málaga.

Con el fin de determinar si esta inserción explica toda la variabilidad natural del contenido de carotenos o por el contrario existen otras mutaciones que pueden modificar la expresión del gen *FcCCD4-B*, en este trabajo se analizaron las regiones promotoras de una colección de accesiones silvestres de *F. chiloensis*. Hay que tener en cuenta que esta variabilidad natural en el contenido de carotenos no tiene por qué tener su explicación en el gen de estudio de este trabajo, pues puede deberse a otros genes implicados. Además, de las accesiones de *F. chiloensis* se incluyeron los parentales de la población de mapeo (SS y USA1) como referencia y los cultivares de *F. x ananassa* ‘Camarosa’ y ‘Candongá’ con el fin de comparar los genotipos de *F. chiloensis* con los de dos cultivares de *F. x ananassa*, siendo además ‘Camarosa’ el cultivar secuenciado para obtener el genoma de referencia (Edger et al., 2019).

El gen *CCD4-B* presenta tres copias u homeólogos en el genoma de referencia *F. x ananassa* ‘Camarosa’ uno en cada subgenoma, excepto en el subgenoma D. Los cebadores utilizados, ccm133 y ccm148, son específicos del subgenoma B para amplificar el promotor del gen *CCD4* en este subgenoma puesto que es dónde se encontró el QTL responsable de la variación Y/W. Por lo tanto, se amplificó por PCR, usando la enzima GoTaq, el promotor del gen *FcCCD4-B* de distintas accesiones y cultivares con el objetivo de poder observar los tamaños de la secuencia del promotor y tener una idea previa de la ausencia o presencia de la inserción. El resultado de esta amplificación queda reflejado en la Figura 11.

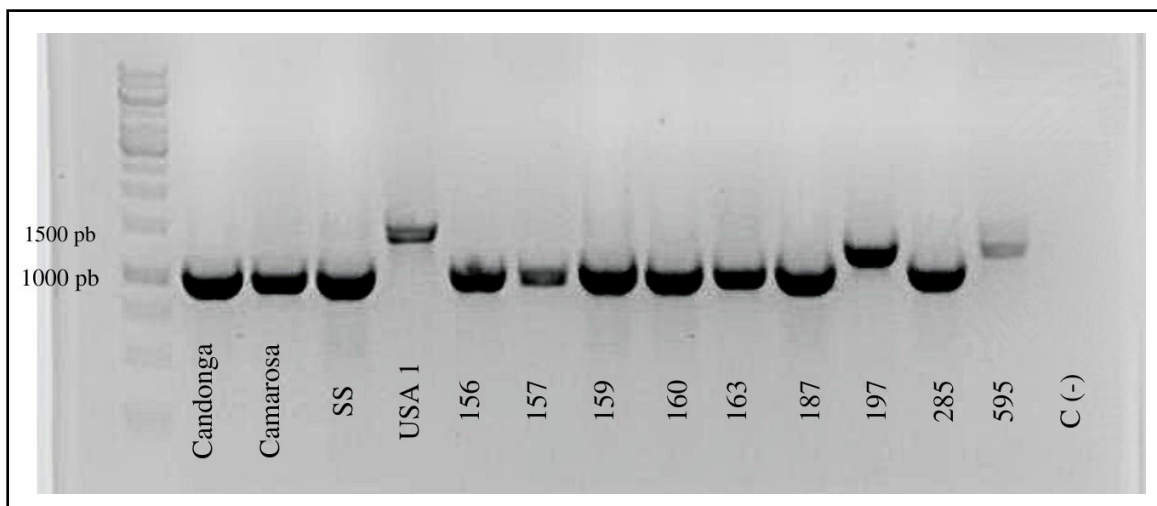


Figura 11: Resultados de la PCR con la enzima GoTaq para la amplificación del promotor del gen *CCD4-B* de diferentes accesiones y cultivares. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. En la imagen se puede observar USA1 con un tamaño de secuencia de 1500 pb aproximadamente, 197 y 595 con un tamaño en la secuencia del promotor intermedio a 1000 pb y 1500 pb. El resto de las accesiones y variedades tienen un tamaño de secuencia de 1000 pb aproximadamente.

Analizando la Figura 11, en el caso de USA1, parental de la población de mapeo, se observa un fragmento de 1500 pb aproximadamente, lo que refleja la existencia de una inserción en la secuencia. Esto, que ya ha sido comprobado previamente en el laboratorio, se demostró que la inserción tiene un tamaño 432 pb que, en este caso, se correlaciona con niveles altos de expresión del gen *FcCCD4-B*. Además, en el caso de USA1 el contenido en carotenoides es bajo, lo que apoyó los resultados obtenidos en los estudios del laboratorio de Mejora y Biotecnología del IFAPA de Málaga. Por otra parte, en la figura queda reflejado que la accesión 595 posee un tamaño de banda de 1200 pb aproximadamente al igual que 197. Por el contrario, todas las demás accesiones tienen un tamaño de 1000 pb aproximadamente.

No se conoce el contenido de carotenoides de todos los cultivares y accesiones que aparecen en la Figura 11, además es difícil determinar si hay acumulación de carotenoides (fruto amarillo) o no (fruto incoloro o blanco). Sin embargo, en algunos casos sí que parece estar claro el fenotipo a simple vista como en el caso de USA1 (ya comentado). En el caso de las accesiones 163 y 156 también parece estar claro que el color del fruto es blanco, parecido pasa en el caso de la 285 que se ve un fenotipo de color amarillo.

Las accesiones 156 y 163 muestran un tamaño de 1000 pb aproximadamente, por lo que se puede pensar que el color blanco del fruto en estos dos casos no está controlado por la inserción en la secuencia del promotor.

Hay que recalcar que en este trabajo se está estudiando la variabilidad natural, solo con los resultados de la PCR del promotor *FcCCD4-B* que se muestra en la Figura 11 se puede observar que las accesiones 595 y 197 tienen un tamaño de secuencia de promotor diferente al resto, por esto se realizó con el DNA de estas dos accesiones una PCR de alta fidelidad con la enzima Phusion (Figura 12). Esta enzima de alta fidelidad comete menos fallos que la enzima GoTaq lo que es muy importante a la hora de identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la secuencia.

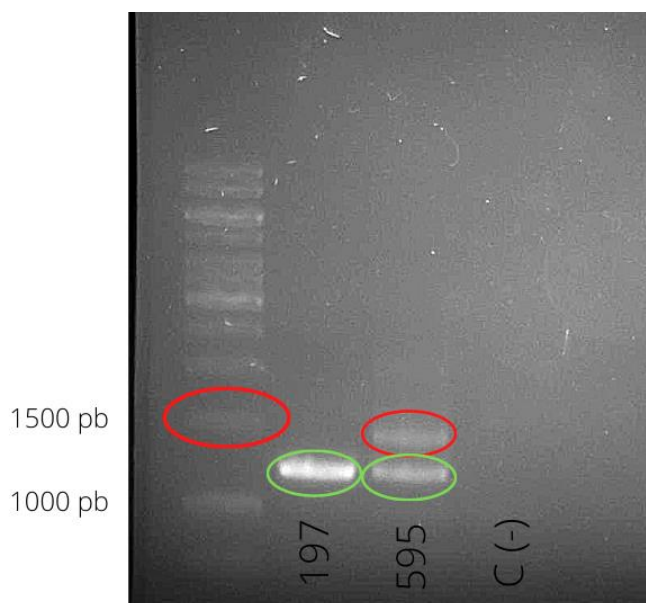


Figura 12: Resultados de la PCR con la enzima Phusion de alta fidelidad para la amplificación del promotor del gen *CCD4-B* en las accesiones 197 y 595 de *F. chiloensis*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. La accesión 595 tiene dos tamaños de banda mientras que la 197 solo tiene un tamaño de secuencia del promotor mayor a 1000 pb.

En el resultado de esta PCR de alta fidelidad (Figura 12), se observa que la accesión 595 tiene dos tamaños diferentes de secuencia del promotor, una tamaño aproximado de 1200 pb (rodeada de verde) y otro tamaño aproximado de casi 1500 pb (rodeada de rojo). Esto nos indica que 595 se trata de una accesión heterocigota. Por otro lado, en la accesión 197 se observa un tamaño de 1200 pb aproximadamente.

- Clonaje de la región promotora del gen *FcCCD4-B*

De entre todas las accesiones en las que se realizó PCR se seleccionaron ocho para llevar a cabo su clonación (Tabla 2).

USA1	159
SS	595
USA2	197
285	156

Tabla 2. Listado de los cultivares y accesiones seleccionadas para clonar.

La selección de estos cultivares y accesiones no fue al azar:

- Los parentales de la población de mapeo (USA1 y SS) se eligieron con la finalidad de comparar los tamaños de la secuencia de los promotores obtenidos en los estudios previos con los nuevos tamaños obtenidos en este trabajo. Además, se incorporó USA2 al estudio para poder mostrar que la secuencia de esta es igual que la de USA1, ya que USA2 no produce frutos, por esta razón se usó USA1 como parental de la población de mapeo.
- La accesión 285 se eligió debido a que se ha visto que su fenotipo es claramente amarillo, de esta manera se puede estudiar la secuencia del promotor *FcCCD4-B* asociada a este fenotipo. En esta accesión cuya secuencia es aproximadamente de 1000 pb se podrá estudiar si además de INDELS hay SNPs que puedan explicar el fenotipo.
- La accesión 159 fue elegida ya que en PCRs obtenidas en otros estudios del laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, se observaba un tamaño ligeramente diferente.

- 595 fue seleccionada al ver los dos diferentes tamaños de secuencia en la PCR de alta fidelidad.
- La accesión 197 fue seleccionada ya que se observó un tamaño de en la secuencia del promotor diferente al resto de accesiones.
- La accesión 156 fue elegida debido a que el color de su fruto es blanco, sin embargo, el tamaño del promotor no parece incluir ninguna inserción, de esta manera se podrá averiguar si la expresión del gen *FcCCD4-B* está controlada por otra mutación en esta accesión.

Se llevo a cabo la ligación de los ocho productos de PCR al plásmido. Esta reacción no es eficiente al 100% por lo que habrá plásmidos que hayan insertado el DNA de interés y otros que no (vector vacío).

El siguiente paso consiste en introducir el plásmido *E.coli*, para que se replique y así obtener un gran número de copias, este proceso es conocido con el nombre de transformación. Cuando se realiza la transformación, el producto de esta se siembra en placas de medio sólido de LB con el antibiótico kanamicina. En este medio con kanamicina, las bacterias que no tengan el plásmido no podrán crecer puesto que este es el que confiere la resistencia al antibiótico (Figura 9). Estas placas se dejaron incubando durante una noche para que las bacterias que hayan insertado el plásmido crezcan. Al día siguiente, con el objetivo de seleccionar las colonias que contenían el plásmido con el DNA de interés (colonias positivas) se llevan a cabo PCRs de diferentes colonias al azar. Las colonias positivas por PCR se sembraron en cultivo líquido para realizar una purificación y extracción del plásmido a través de un protocolo de miniprep alcalina. Una vez hecho esto, se comprobó por segunda vez si las colonias eran positivas mediante una digestión del plásmido ya purificado utilizando EcoRI como enzima de restricción.

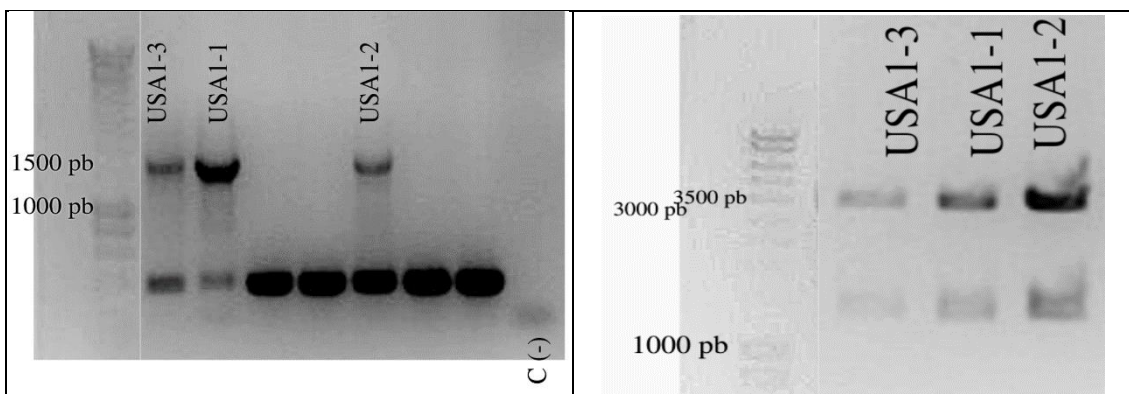
A continuación, se plasman los resultados de las PCR de colonias y de las digestiones plasmídicas de todos los cultivares y accesiones. Para poder correlacionar los diferentes tamaños de la secuencia del promtor *FcCCD4-B* con el fenotipo hay que tener en cuenta

que el color interno de los frutos de algunas accesiones y de los cultivares no es conocido. Además, en los estudios previos del laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga se llevó a cabo un estudio del contenido en carotenos en los individuos de la población de mapeo. Por ello, en el caso de los individuos de la población de mapeo usados en este estudio se puede afirmar que la concentración de carotenoides es mayor en frutos amarillos y menor en frutos blancos.

- USA1

Como se observa en la Figura 13, se llevaron a cabo PCR de diferentes colonias de USA1, entre ellas solo había tres colonias positivas (USA1-1, USA1-2 y USA1-3). Como una segunda comprobación, en Figura 14 se observa la digestión del plásmido de las colonias USA-1, USA1-2 y USA1-3. En esta imagen del gel de agarosa de la digestión se pueden observar dos bandas para cada accesión: una banda que corresponde a una secuencia de 3500 pb (el vector) y otra banda, con una secuencia de aproximadamente 1500 pb que corresponde a la secuencia insertada.

USA1 como ya se ha comentado es un individuo que pertenece a la población de mapeo. Se conoce que el color interno de su fruto es blanco y esto está ligado a una menor concentración de carotenoides en el fruto como se demostró en los estudios previos. El tamaño de secuencia obtenido en la amplificación del promotor *CCD4* y en la digestión de las colonias positivas es de 1500 pb, esto se correlaciona con la presencia de la inserción en la secuencia del promotor y con una mayor expresión de *FcCCD4-B*.



<p>Figura 13: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de USA1 en las que se ha amplificado el promotor del gen <i>CCD4-B</i>. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-)</p>	<p>Figura 14: Resultado de la digestión plasmídica con EcoRI de las colonias USA1-1, USA1-2 y USA1-3. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. La banda de 3500 pb</p>
--	---

<p>corresponde con el control negativo. USA1-1, USA1-2 y USA1-3 son las colonias positivas, el resto de las colonias no han insertado el gen de interés.</p>	<p>corresponde con la secuencia del vector mientras que la banda de 1500 pb aproximadamente corresponde con la secuencia del promotor <i>FcCCD4-B</i>.</p>
--	--

- SS

En un primer momento se decidió realizar digestión del plásmido de varias colonias, sin previa PCR de estas. En la Figura 15 se ve la única colonia de SS positiva de estas digestiones (SS-1). Se puede observar la banda correspondiente a la secuencia del vector y la banda de la secuencia correspondiente al promotor del gen de estudio. Para hallar más colonias que contengan el DNA de interés de este cultivar, se llevaron a cabo PCRs de diferentes colonias (Figura 16), de entre ellas solo una colonia resultó positiva: SS-2. De esta colonia, se realizó la digestión (Figura 17) después de aislar el plásmido y se corroboró que el plásmido contenía el DNA de interés.

SS es al igual que USA1, un individuo perteneciente a la población de mapeo y es conocido que el color interno de su fruto es amarillo, lo que está asociado a un alto contenido en carotenoides en el fruto. El tamaño de la secuencia del promotor de SS como se ve en las Figuras 16 y 17 es de aproximadamente 1000pb, este tamaño indica que en la secuencia del promotor *CCD4-B* no está presente la inserción y como se comprobó en los estudios realizados, esto se correlaciona con una menor expresión del gen *CCD4-B*.

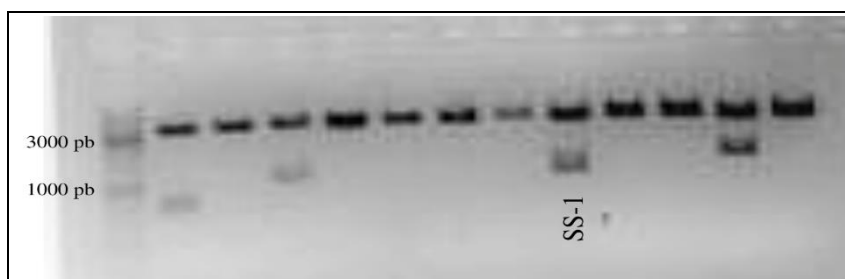
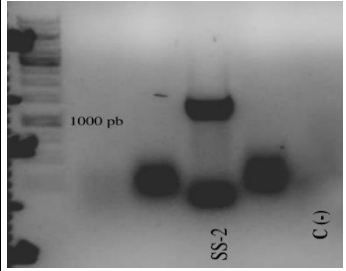
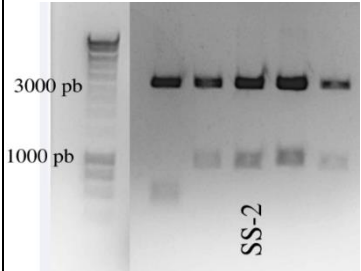


Figura 15: Resultado de la digestión plasmídica de varias accesiones con la enzima EcoRI. Se digirieron colonias de SS y de otras accesiones (595 y USA2). El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Una colonia de SS (SS-1) se demostró que era positiva ya que había insertado el gen de interés.

	
<p>Figura 16: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de SS en las que se ha amplificado el promotor <i>FcCCD4-B</i>. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. En el caso de una de las colonias no ha habido amplificación. Entre las restantes colonias en las que sí que se ha amplificado el gen de interés solo una resultado ser positiva (SS-2).</p>	<p>Figura 18: Resultado de la digestión del plásmido de la colonia positiva SS-2 con la enzima EcoRI. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se vuelve a confirmar que esta colonia ha insertado el gen de interés. Las otras bandas que se observan en el gel corresponden a otras digestiones realizadas de otras accesiones (Ver más adelante)</p>

- USA2

Ya ha sido mencionado que USA1 es una accesión emparentada con USA2 y que USA1 se utilizó como parental en la población de mapeo ya que USA2 no produce frutos. Se observaron los tamaños de la secuencia del promotor del gen *CCD4* de esta accesión, pero la realidad es que el tamaño de la secuencia debería ser el mismo o similar que el de USA1. En el caso de USA2-1, se realizó la digestión del plásmido sin PCR de colonias antes (Figura 19). En cambio, en el caso de USA2-2 se llevó a cabo la PCR de varias colonias en la cual solo esta resultó ser positiva (Figura 20) y después se realizó la digestión del plásmido de esta colonia (Figura 21). Con estas dos imágenes se puede comprobar, como era de esperar, que el tamaño de la secuencia del promotor *FcCCD4-B* es de aproximadamente 1500 pb.

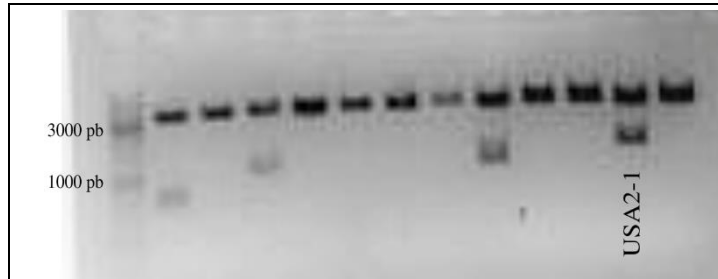


Figura 19: Resultado de la digestión del plásmido de varias accesiones con la enzima EcoRI. Se digirieron colonias de USA2 y de otras accesiones y cultivares (595 y SS). El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Una colonia de USA2 (USA2-1) se demostró que era positiva ya que había insertado el gen de interés.

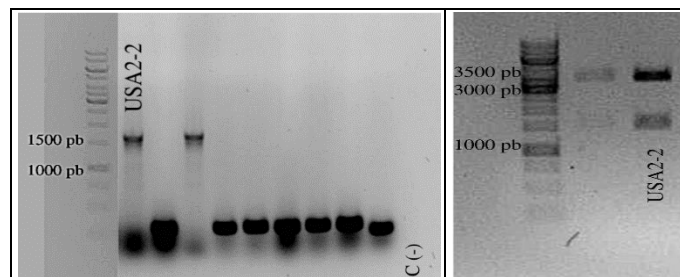


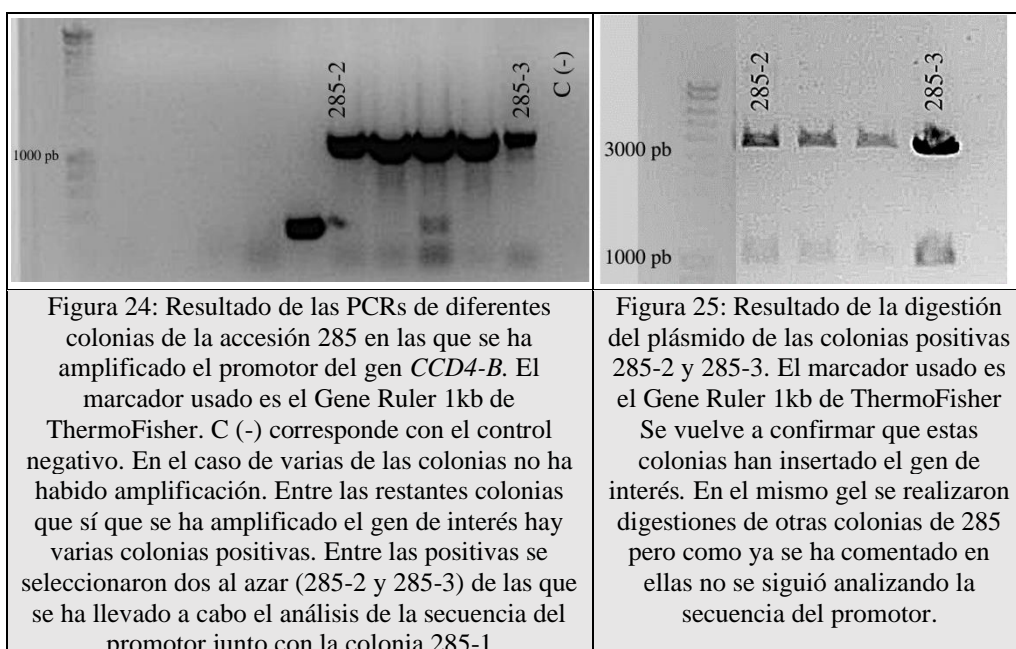
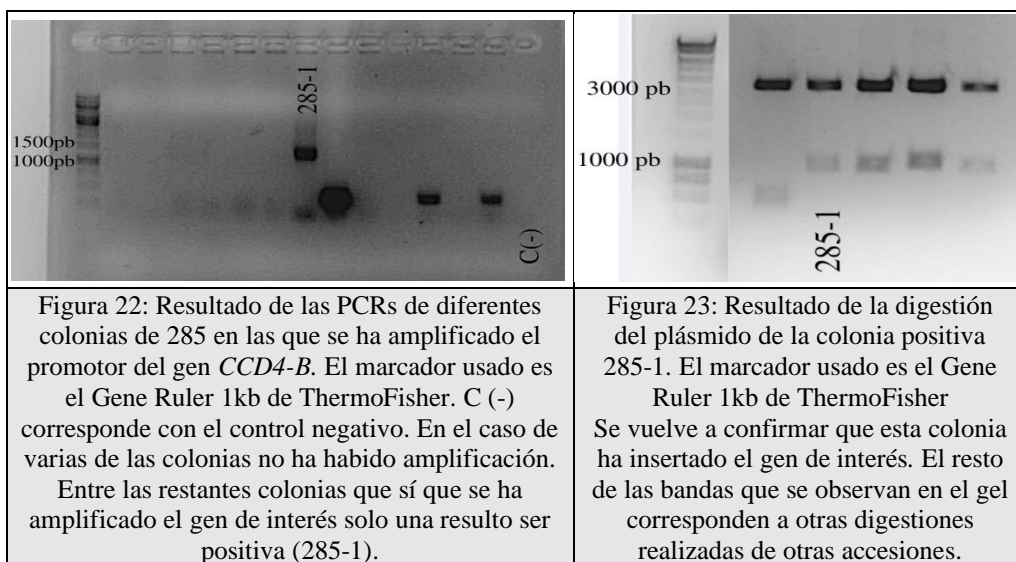
Figura 20: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de USA2 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. En este caso hay dos colonias positivas de la accesión USA2, pero solo esta señalada USA2-2 ya que es la que finalmente se utilizó (junto con USA2-1) para estudiar la secuencia del promotor

Figura 21: Resultado de la digestión del plásmido de las dos colonias positivas de la Figura 20. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se demostró que ambas colonias eran positivas, pero finalmente se analizó la secuencia de USA2-2 (además de la de USA2-1).

- 285

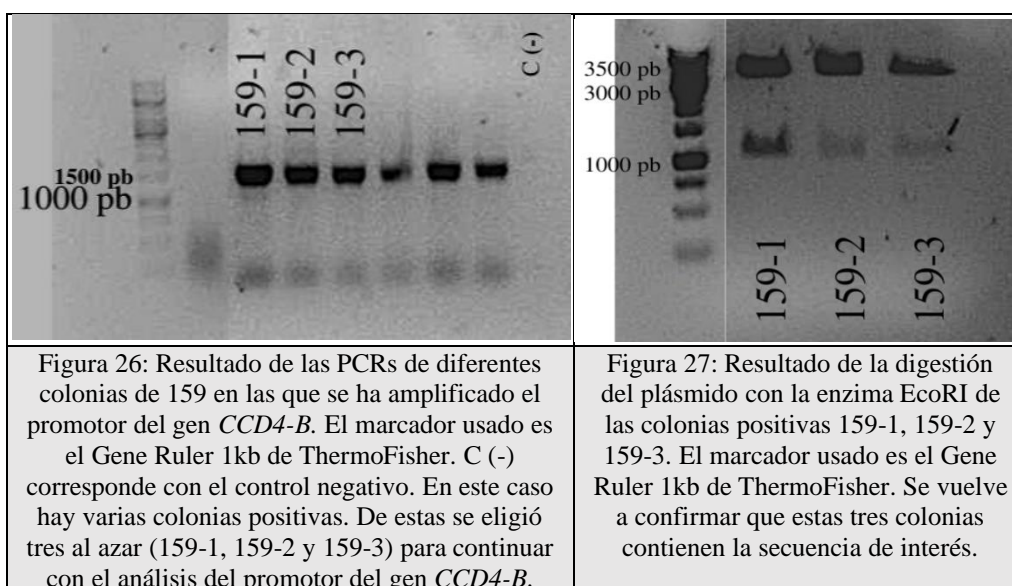
En la Figura 22 podemos observar el gel en el que se han plasmado los resultados de las PCRs de diferentes colonias de la accesión 285, la mayoría no amplificaron por lo que solo vemos una colonia positiva: 285-1. De esta colonia se purificó el plásmido y se digirió (Figura 23). Con el fin de obtener más colonias positivas de esta accesión se

realizaron más PCRs de diferentes colonias (Figura 24) y entre ellas se consiguieron dos colonias que habían insertado la secuencia de interés: 285-1 y 285-2. Siguiendo el mismo proceso de estas dos colonias positivas, se purificó el plásmido y este se digirió (Figura 25). Haciendo un cómputo global de estas cuatro figuras, se puede ver que el tamaño de la secuencia de interés de 285 es de aproximadamente 1000 pb. La accesión 285 no pertenece a la población de mapeo, pero el color interno de su fruto es conocido que es de color amarillo.



- 159

Observando la Figura 26 en la cual aparece un gel de agarosa con distintas PCRs de colonias, se puede ver que solo tres de todas estas colonias son positivas: 159-1, 159-2 y 159-3. Además, en la Figura 27 aparece la digestión de estas tres colonias. Con estas dos figuras, se puede ver que el tamaño de la secuencia del promotor *FcCCD4-B* en esta accesión es de 1000pb aproximadamente. El contenido de carotenoides de esta accesión es totalmente desconocido.



- 595

Para obtener copias de la secuencia del promotor *FcCCD4-B* con el fin de analizarla se llevaron a cabo varias PCRs de diferentes colonias hasta que se obtuvieron 5 colonias positivas: 595-1, 595-2, 595-3, 595-4 y 595-6 (Figuras 28, 30, 32 y 34). Estas colonias se digirieron con la enzima *EcoRI* con el fin de volver a comprobar que habían insertado el gen de interés (Figuras 29, 31 y 33).

En la PCR que se realizó con la enzima de alta fidelidad Phusion (Figura 12) se observó que se amplificaban dos bandas con dos diferentes tamaños de secuencia, un tamaño de aproximadamente 1200 pb y otro de 1500 pb. Por ello se llevó a cabo la clonación de los

productos de PCR y como iban mezclados los dos alelos se esperaba que se clonaran ambos. Al realizar las PCRs de diferentes colonias se esperaba que algunas tuvieran en alelo con la secuencia de 1500 pb y otras con 1200 pb ya que la elección de las colonias fue totalmente al azar. La única colonia en la cual la secuencia del promotor fue de 1200 pb fue 595-1 (Figura 28). El resto de las colonias positivas posee un tamaño de secuencia de 1500 pb. El contenido en carotenoides y el color interno de la accesión 595 no está determinado.

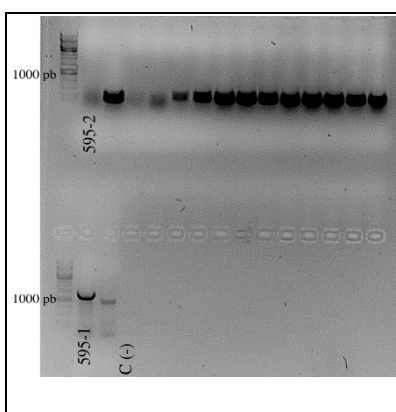


Figura 28: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de 595 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. La gran mayoría de las colonias no habían insertado el gen de interés. Se selecciono 595-1 ya que esta sí que había insertado el gen y además se seleccionó 595-2 para continuar con el análisis de la secuencia ya que en esta ultima la amplificación no ha sido correcta.

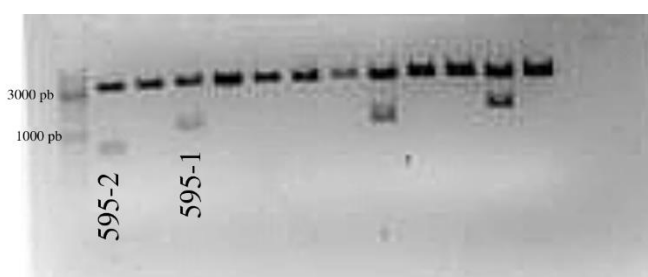


Figura 29: Resultado de la digestión del plásmido de varias accesiones con la enzima EcoRI. Se digirieron colonias de USA2 y de otras accesiones y cultivares (595 y SS). El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se demostró que 595-2 y 595-1 son colonias positivas ya que se observan dos bandas: una correspondiente al vector y otra a la secuencia del promotor *FcCCD4-B*. Al digerir estas dos colonias podemos comprobar que la colonia 595-1 tiene un tamaño de banda menor a 1000 pb, esto se puede deber a que esta colonia tenga en su secuencia un sitio diana para la enzima EcoRI.

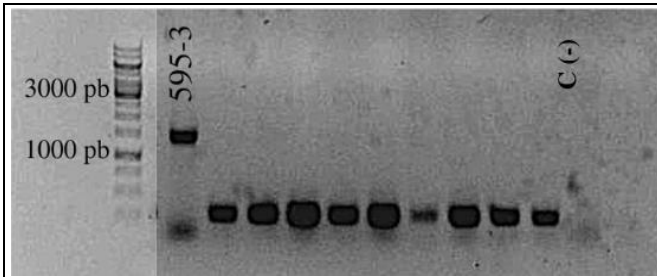


Figura 30: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de 595 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. La gran mayoría de las colonias no habían insertado el gen de interés. Se selecciono 595-3 para continuar con el análisis de la secuencia

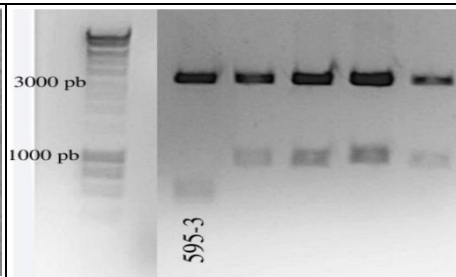


Figura 31: Resultado de la digestión del plásmido de varias accesiones con la enzima EcoRI. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se demostró que 595-3 había insertado el gen de interés ya que se observan dos bandas: una correspondiente al vector y otra a la secuencia del promotor *FcCCD4-B*. La banda tiene un tamaño menor a 1000 pb por la posibilidad de la existencia de un sitio diana para el enzima EcoRI en su secuencia promotora. El resto de las digestiones que se observan en el gel corresponden a otras accesiones analizadas.

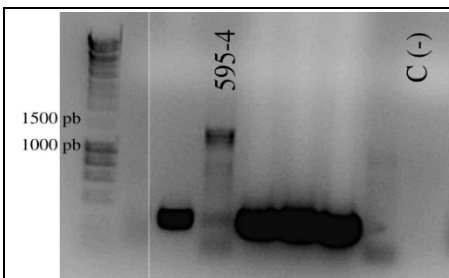


Figura 32: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de 595 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. En el caso de una de las colonias no ha habido amplificación. La gran mayoría de las colonias no habían insertado el gen de interés. Se selecciono 595-4 para continuar con el análisis de la secuencia.

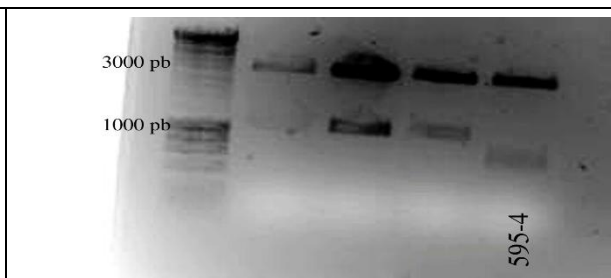


Figura 33: Resultado de la digestión del plásmido de varias accesiones con la enzima EcoRI. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se demostró que 595-4 había insertado el gen de interés ya que se observan dos bandas. La banda correspondiente a la secuencia de interés tiene un tamaño menor a 1000 pb debido a la posibilidad de la existencia de un sitio diana para el enzima EcoRI en su secuencia promotora. Las otras bandas que se observan en el gel corresponden a otras digestiones realizadas en la accesión 156 (Ver más adelante)

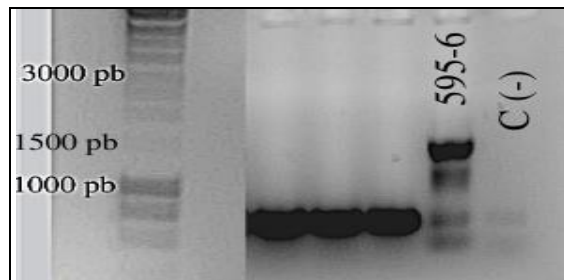


Figura 34: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de 595 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. La gran mayoría de las colonias no habían insertado el gen de interés. Se selecciono 595-6 para continuar con el análisis de la secuencia

- 197

Se llevaron a cabo PCRs de diferentes colonias (Figura 35) en la cual solo dos colonias habían insertado el gen de interés: 197-1 y 197-2. Además, se encontró otra colonia que había insertado el gen de interés (197-3) en una PCR de colonias que se realizó con el fin de obtener un total de tres colonias en las que analizar el promotor de *FcCCD4-B*. En los resultados de las PCRs de las colonias se puede observar que el tamaño de la secuencia amplificada correspondiente con el promotor del gen *CCD4-B* es de aproximadamente 1500 pb. De estas tres colonias positivas se realizó la digestión para separar el plásmido del vector de interés, el resultado lo vemos en la Figura 36. En esta figura se puede observar la banda correspondiente a la secuencia del vector (3500pb) y las bandas correspondientes al gen de interés, que son menores a 1000 pb, esto se puede deber a que la secuencia del promotor en esta accesión tenga una diana para la enzima EcoRI y esta ha fragmentado la secuencia del promotor en dos. Para esta accesión tampoco está determinado el color interno del fruto ni su contenido en carotenos.

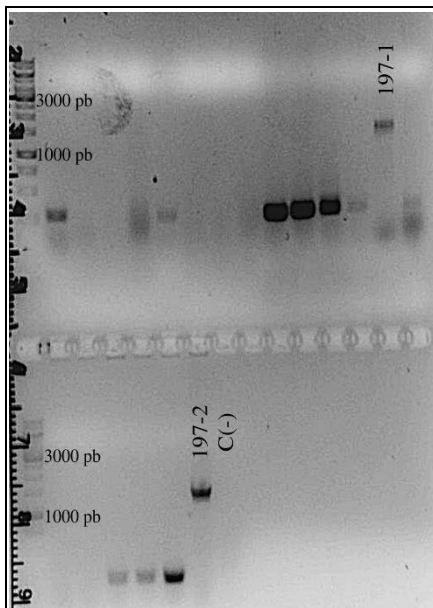


Figura 35: Resultado de las PCRs de diferentes colonias de 197 en las que se ha amplificado el promotor del gen *CCD4-B*. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. C (-) corresponde con el control negativo. En el caso de varias de las colonias no ha habido amplificación. Entre las restantes colonias que sí que se ha amplificado el gen de interés hay dos colonias positivas 197-1 y 197-2.

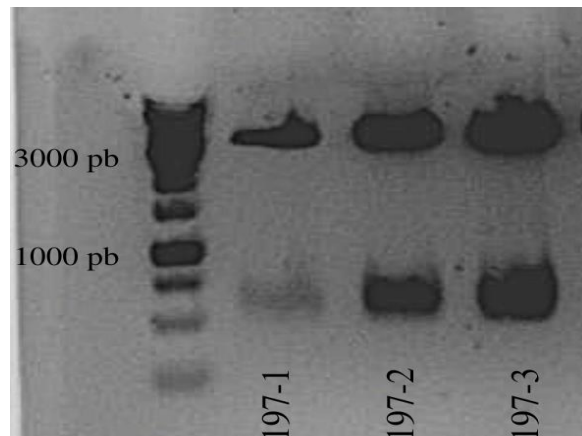
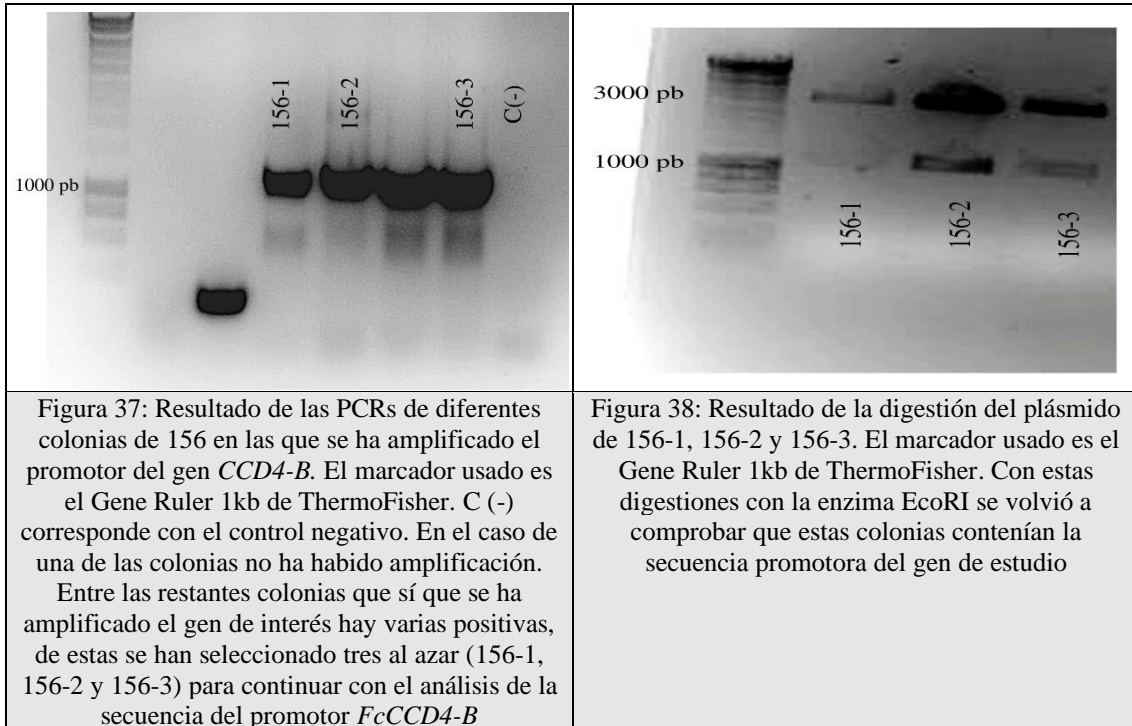


Figura 36: Resultado de la digestión del plásmido de 197-1, 197-2 y 197-3. El marcador usado es el Gene Ruler 1kb de ThermoFisher. Se comprobó que estas colonias habían insertado el DNA de interés y en la imagen se puede observar la banda del vector (3500 pb) y otra banda menor de 1000 pb. Esta banda corresponde con el DNA de interés que ha sido cortado en algún sitio dentro de la secuencia del promotor debido a que tendría una secuencia diana de la enzima con la que se ha llevado a cabo la digestión.

- 156

En la Figura 37, se observa el gel de agarosa en el que fueron plasmados los resultados de las PCRs de colonias en las que se hallaron tres colonias que contenían el DNA de interés: 156-1, 156-2 y 156-3, la digestión plasmídica de estas colonias se observa en la Figura 38. Poniendo en conjunto lo que se observa en estas dos figuras, se puede ver que el tamaño de la secuencia de 156 es de aproximadamente 1000 pb. El color del fruto de esta accesión se determinó que era blanco, por eso es interesante estudiar la secuencia del promotor *FcCCD4-B* de estas accesión, porque parece que la expresión del gen *CCD4* no está controlado por la ausencia/presencia de la inserción en la secuencia promotora.



- **Análisis de las secuencias promotoras del gen *FcCCD4-B* en las accesiones de *Fragaria chiloensis***

Los promotores del gen de interés fueron secuenciados con el fin de analizar si existen otras mutaciones candidatas a modificar la expresión del gen *FcCCD4-B*. Esta secuenciación la realizó una empresa externa y se trata de una secuenciación de Sanger. Las secuencias de las diferentes accesiones se ensamblaron y alinearon con el programa Geneious 7.19 para poder llevar a cabo un análisis comparativo entre todas ellas. Además de las secuencias obtenidas en este trabajo, se alinearon las secuencias de F2-52 (fruto de color blanco) y F2-83 (fruto de color amarillo) provenientes de la población de mapeo. El resultado de este ensamblaje y alineamiento de las diferentes secuencias se puede observar en las Figuras 39, 40 y 41.

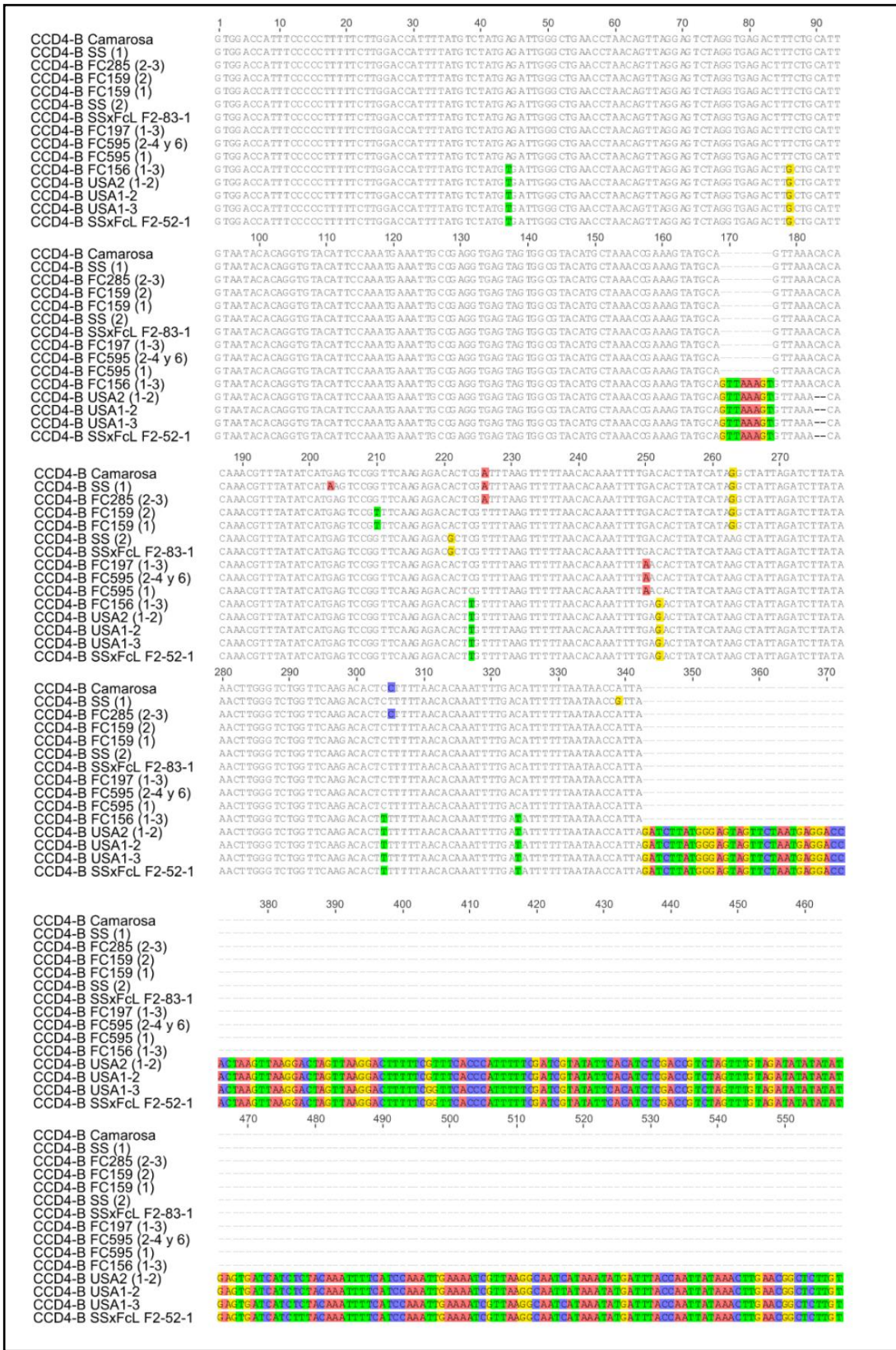


Figura 39: Alineamiento de las secuencias del promotor del gen *CCD4-B* de diferentes cultivares y accesiones. Continúa en la Figura 40.

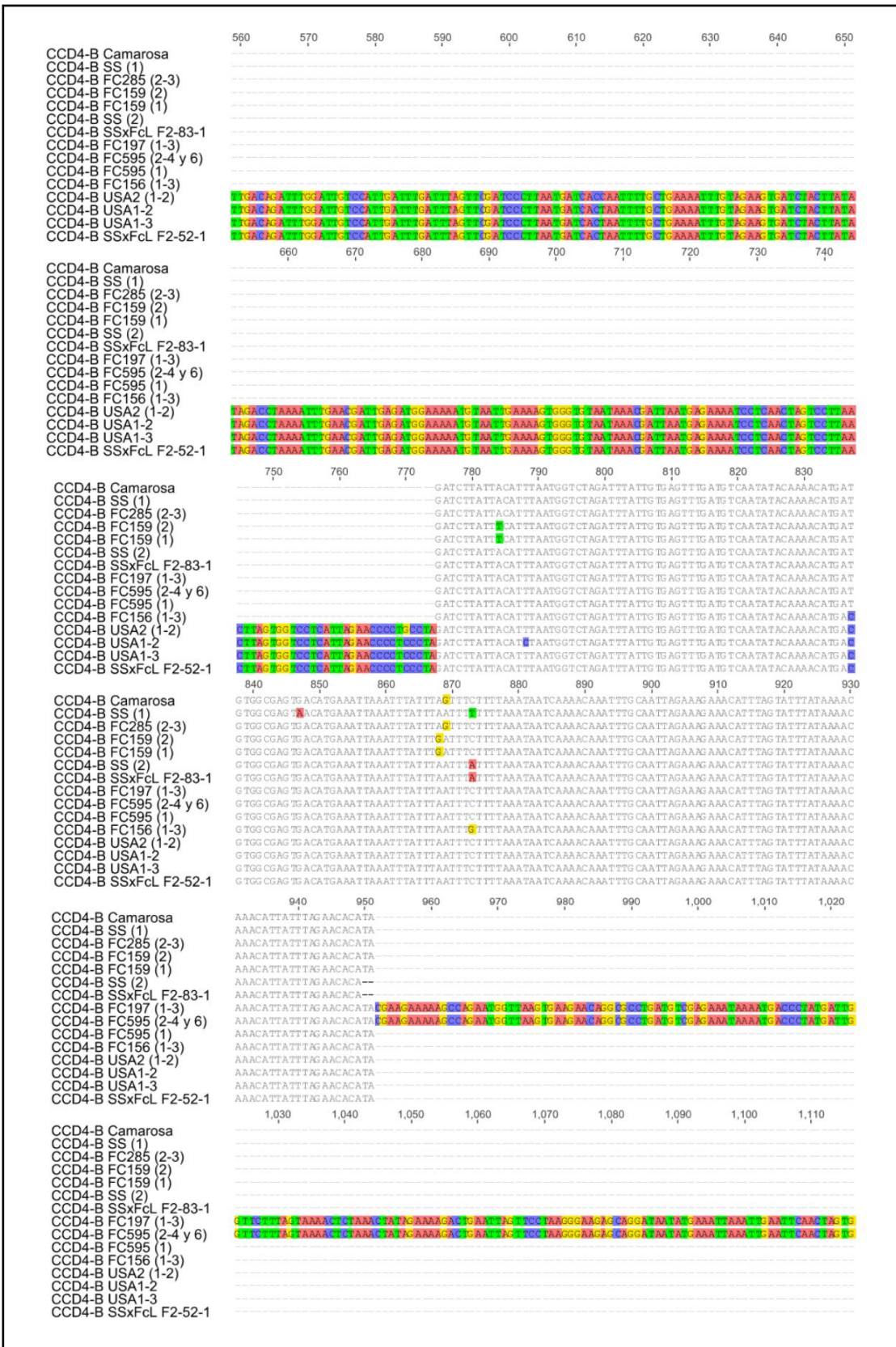


Figura 40: Alineamiento de las secuencias del promotor del gen *CCD4-B* de diferentes cultivares y accesiones. Continua en la Figura 41.

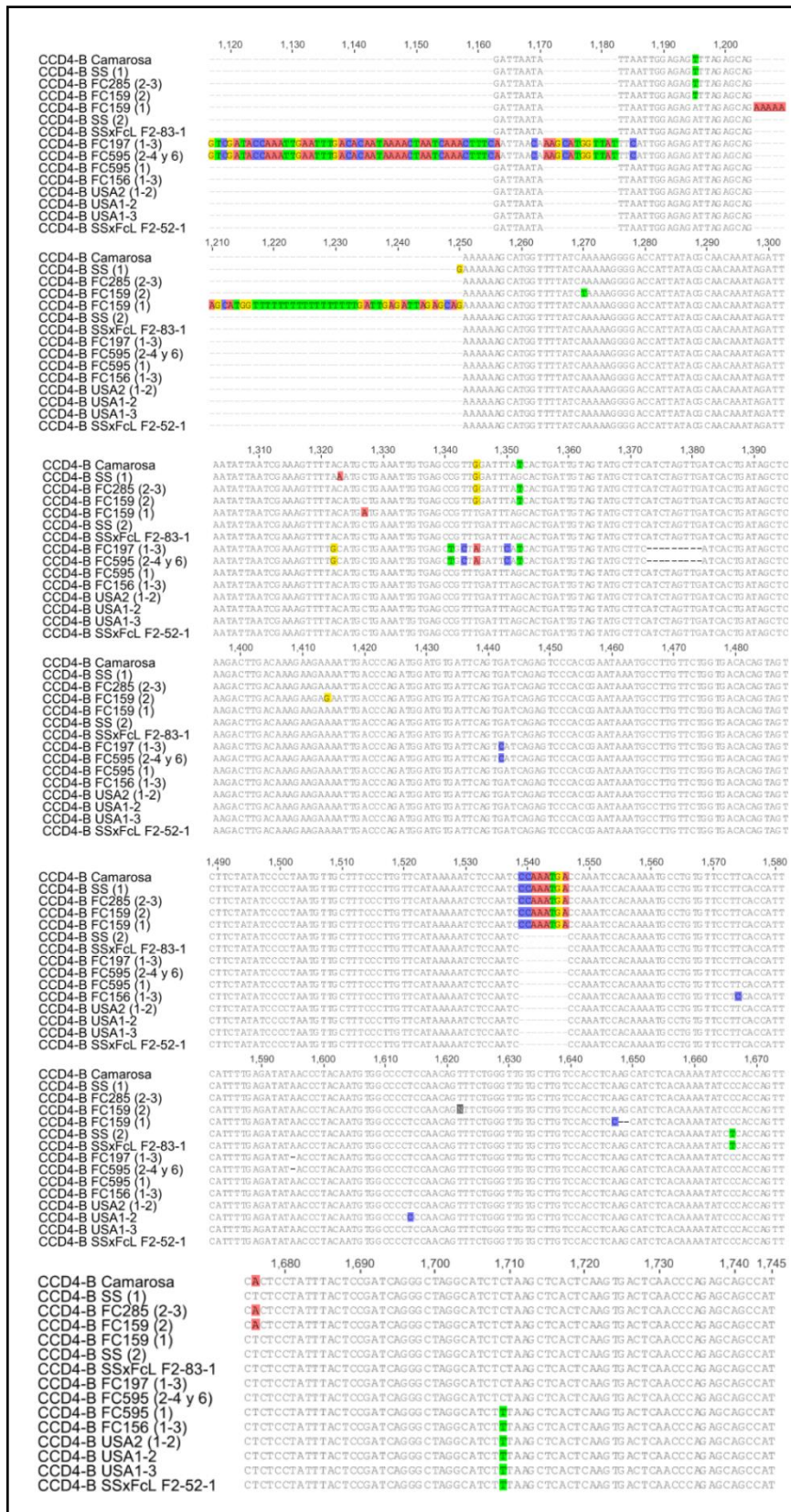


Figura 41: Alineamiento de las secuencias del promotor del gen *CCD4-B* de diferentes cultivares y accesiones.

Ya ha sido comentado que, el contenido en carotenos y el color interno del fruto solo es conocido en algunas accesiones y cultivares. USA1 posee un fruto de color blanco y un bajo contenido en carotenoides, y como en los estudios previos del laboratorio de Mejora y Biotecnología de fresa del IFAPA de Málaga, ya se ha concretado, este bajo contenido en carotenoides está correlacionado con presencia de una inserción en el promotor del gen *FcCCD4-B* de 432 pb. El caso de USA2 es similar ya que es una accesión emparentada con USA1. En los resultados de la secuenciación se puede ver la secuencia y longitud de esta inserción desde la posición 343 hasta la 775 (Figuras 39 y 40). Por otro lado, la accesión F2-52 de la población de mapeo, cuyo fruto también es de color blanco en el interior a consecuencia de un bajo contenido en carotenoides, en la secuenciación también se observa la presencia de esta inserción, y esta también se correlaciona con la expresión del gen *CCD4-B*. Además, de estas tres accesiones de fruto blanco, se conocía que la accesión 156 también tiene un fruto internamente blanco, pero en este caso no presenta la inserción en la secuencia del promotor. En el resto de las accesiones secuenciadas o no se conoce la variación Y/W o se conoce que el color interno del fruto es amarillo (en el caso de SS y 285). Ninguna de estas accesiones presenta la inserción en el promotor del gen *FcCCD4-B*.

Analizando con un mayor detalle el alineamiento de las secuencias, se puede observar que USA1, USA2, 252 y 156 (todas con el color del fruto blanco) tienen varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la posición 304 y en la posición 323 en las cuales en vez de estar el nucleótido citosina como en el resto de las accesiones y cultivares, hay una timina (T). Además de esto, se encontraron otros SNPs en las secuencias de estas accesiones en la posición 44 (T), en la posición 86 (G), 224 (T), 253 (G), 837(G) y 1709 (T). También se puede observar una inserción de 8 nucleótidos en la posición 169. En resumen, estas cuatro accesiones de *F.chiloensis* que presentan un fenotipo de color blanco para el carácter del color interno de la fruta tienen mutaciones en su secuencia que las hace diferentes a las secuencias del resto de accesiones y cultivares. En este momento, cabe destacar que en *Arabidopsis*, los polimorfismos de un solo nucleótido y las inserciones y deleciones en el locus pueden ser una razón fundamental para la diferencia de expresión de *CCD4* (Gonzalez-Jorge et al., 2014).

La teoría del ligamiento genético se refiere a la cercanía de secuencias de ADN en el mismo cromosoma, cuanto mayor sea la cercanía mayor posibilidad hay de que las secuencias se hereden juntas. Estos polimorfismos en la secuencia, cerca del sitio de la inserción, pueden estar ligados a la inserción de 432 pb y heredarse conjuntamente. Sin embargo, el hecho de que un SNP se herede junto a la inserción no quiere decir que sea la causa del fenotipo. Es decir, puede ser que los SNPs se hereden junto con la inserción de 432 pb pero que no sean la causa del fenotipo, pero al saber que se heredan junto la inserción nos ayudan a predecir el fenotipo de la fresa en un futuro (SNPs predictivos). Por el contrario, algunos SNPs pueden causar el cambio de genotipo (SNPs casuales). Por ejemplo, en el caso de la accesión 156 la inserción no está presente, pero sí que están presentes los polimorfismos que se heredan junto a esta. Al presentar esta accesión un color interno del fruto blanco se podría pensar que los SNPs puedan causar el cambio de fenotipo, pero para poder confirmar todo esto habría que validar estos SNPs como marcadores moleculares.

En lo que se refiere a las accesiones 595 y 197 hay que destacar la presencia de una inserción de 321 pb desde la posición 952 hasta la posición 1182 (Figuras 40 y 41). Esta inserción se presenta en la secuencia del promotor *FcCCD4-B* de las tres colonias de la accesión 197 y en las todas las colonias de la accesión 595 menos en la colonia 595-1. Esto indica que existe una secuencia diana para la enzima EcoRI ya que en 197-1, 197-2, 197-3, 595-2, 595-3, 595-4 y 595-6 al digerir su plásmido con esta enzima se podría ver una banda con un tamaño menor a 1000pb, resultado del corte de esta enzima en algún lugar de la inserción.

En resumen, se ha podido comprobar que existe variabilidad en la región promotora del gen *CCD4* en los genotipos analizados y que es probable que esa variabilidad se traduzca en cambios en expresión del gen *CCD4*. Sin embargo, es importante destacar que las diferencias en la secuencia del promotor no indican directamente que vaya a haber diferencias en la expresión. Se estudia la secuencia para ver si existen polimorfismos que pudieran explicar posibles diferencias en los niveles de expresión cuando estos se estudien en el futuro.

5. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio del promotor del gen *FcCCD4-B* en diferentes cultivares y accesiones de dos especies del género *Fragaria*.

- Se ha demostrado que la inserción en la secuencia del promotor del gen *CCD4-B* identificada en la población de mapeo no va ligada a la variación Y/W en todos los casos.
- La variación Y/W puede tener su explicación tanto en la inserción ya mencionada, en algunas de las mutaciones de la secuencia del promotor o estar controlada por otro gen.
- Se ha descubierto otra inserción diferente a la detectada en la población de mapeo, en otras accesiones (197 y 595) que contiene una secuencia diana para el enzima EcoRI.
- No todos los SNPs que se ven el alineamiento están ligados al fenotipo. En algunos se tratará de SNPs causales, otros serán SNPs predictivos y algunos de ellos no darán ningún tipo de información.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- **Utilidad de los SNPs encontrados para el desarrollo de marcadores moleculares**

Los SNPs encontrados en los resultados de la secuenciación realizada en este trabajo, pueden ser útiles para el desarrollo de nuevos marcadores moleculares en las accesiones estudiadas. Para comprobar esto hay que validar los marcadores. Hay que prestar atención a los SNPs que se ven en la secuencia ya que al igual que algunos de estos nos pueden servir para predecir el fenotipo habrá otros que no sean predictivos o no den ninguna información.

- **Posibles repercusiones en la expresión de *FcCCD4-B*.**

Hay mucho campo de investigación abierto para poder estudiar cómo es controlado el color interno del fruto en las accesiones utilizadas en este estudio y en otras especies del

género *Fragaria*. Es importante llevar a cabo un análisis del contenido de carotenoides para poder relacionarlo con la variación Y/W y relacionar esta con la presencia/ausencia de la inserción en el promotor del gen *CCD4-B*. Además de estudiar la expresión del gen *CCD4-B* hay que tener siempre en cuenta la posibilidad de la existencia de otros genes candidatos que puedan controlar el color interno del fruto de la fresa, tanto en las accesiones utilizadas en este estudio como en otras especies del género *Fragaria*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bonet Gigante, J. (2010). *Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en *Fragaria diploide* para la mejora de cultivo de fresa* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Bacerlona]. <https://ddd.uab.cat/?ln=ca>
- Botella-Pavía, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, *126*(3), 369–381. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2006.00632.X>
- Cárdenas-Navarro, R., López-Pérez, L., & Lobit, P. (2019). Efecto de la época de aplicación del N y período de cosecha en la producción y calidad de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch). *Scientia Agropecuaria*, *10*(3), 337–345. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2019.03.03>
- Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., Smith, R. D., Teresi, S. J., Nelson, A. D. L., Wai, C. M., Alger, E. I., Bird, K. A., Yocca, A. E., Pumplin, N., Ou, S., Ben-Zvi, G., Brodt, A., Baruch, K., Swale, T., ... Knapp, S. J. (2019). Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics* *2019 51:3*, *51*(3), 541–547. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0356-4>
- Ganal, M. W., Altmann, T., & Röder, M. S. (2009). SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2008.12.009>

- Gil, M. & Alvarez. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(3), 46–59. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=02585936&v=2.1&it=r&id=G ALE%7CA321057396&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Gonzalez-Jorge, S., Ha, S. H., Magallanes-Lundback, M., Gilliland, L. U., Zhou, A., Lipka, A. E., Nguyen, Y. N., Angelovici, R., Lin, H., Cepela, J., Little, H., Buell, C. R., Gore, M. A., & DellaPenna, D. (2014). CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE4 Is a Negative Regulator of β -Carotene Content in Arabidopsis Seeds. *The Plant Cell*, 25(12), 4812–4826. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.119677>
- Hannum, S. M. (2010). Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Food Science and Nutrition*, 44(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408690490263756>
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J. (2016). Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants. *Trends in Plant Science*, 21(9), 792–803. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.06.001>
- Hummer, K. E., Bassil, N., & Njuguna, W. (2011). *Fragaria*. En *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits* (pp 17–44). Springer.
- Kayesh, E., Shangguan, L., Korir, N. K., Sun, X., Bilkish, N., Zhang, Y., Han, J., Song, C., Cheng, Z. M., & Fang, J. (2013). Fruit skin color and the role of anthocyanin. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(10), 2879–2890. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1332-8>
- Liston, A., Cronn, R., & Ashman, T. L. (2014). *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, 101(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/AJB.1400140>
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Francisco J., H. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149–155. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2018.04.004>
- Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2014). Nutrient management in strawberry: effects on yield, quality and plant health. En *Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits* (pp.239-267). Nova.
- Uz-Zaman, A., Al-Khayri, J. M., & Islam, R. (2018). Genetic improvement of strawberry (*Fragaria × ananassa* duchesne). *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, 3, 217–275. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_6
- Varghese, R., S., U. K., C., G. P. D., & Ramamoorthy, S. (2021). Unraveling the versatility of CCD4: Metabolic engineering, transcriptomic and computational approaches. *Plant Science*, 310, 110991. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.110991>
- Wen, L., Wang, Y., Deng, Q., Hong, M., Shi, S., He, S., Huang, Y., Zhang, H., Pan, C., Yang, Z., Chi, Z., & Yang, Y. (2020). Identifying a Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD4) Gene Controlling Yellow/White Fruit Flesh Color of “Piqiutao” (White Fruit Flesh) and Its Mutant (Yellow Fruit Flesh). *Plant Molecular Biology Reporter*, 38(4), 513–520. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01213-2>
- Zambon, A., Facco, P., Morbiato, G., Toffoletto, M., Poloniato, G., Sut, S., Andriago, P., Dall’Acqua, S., de Bernard, M., & Spilimbergo, S. (2022). Promoting the preservation of strawberry by supercritical CO2 drying. *Food Chemistry*, 397, 133789. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133789>
- Zheng, X., Yang, Y., & Al-Babili, S. (2021). Exploring the Diversity and Regulation of Apocarotenoid Metabolic Pathways in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 2894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787049>

