

# DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“Functional characterization of molecular  
regulatory mechanisms controlling the ripening  
in strawberry fruit”**

**“Caracterización funcional de mecanismos  
reguladores del proceso de la maduración del  
fruto de fresa”**

TESIS DOCTORAL

**Félix Juan Martínez Rivas**

Directores: Rosario Blanco Portales  
Francisco Javier Molina Hidalgo

Córdoba, Febrero 2021

TITULO: *Caracterización funcional de mecanismos reguladores del proceso de la maduración del fruto de fresa*

AUTOR: *Félix Juan Martínez Rivas*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**“Functional characterization of molecular  
regulatory mechanisms controlling the  
ripening in strawberry fruit”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Félix Juan Martínez Rivas**, Graduado en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Córdoba con la mención de *Doctorado Internacional*

Córdoba, Febrero de 2021







UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ROSARIO BLANCO PORTALES, Investigadora Ramón y Cajal y FRANCISCO JAVIER MOLINA HIDALGO, Investigador postdoctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

**Certificamos**

Que FÉLIX JUAN MARTÍNEZ RIVAS, Graduado en Bioquímica por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “**Functional characterization of molecular regulatory mechanisms controlling the ripening in strawberry fruit**”.

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 febrero de 2021.

Dra. Rosario Blanco Portales

Dr. Francisco Javier Molina Hidalgo





**TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: “Functional characterization of molecular regulatory mechanisms controlling the ripening in strawberry fruit”.**

**DOCTORANDO/A: Félix Juan Martínez Rivas**

**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 graduado **Félix Juan Martínez Rivas** ha desarrollado, en el seno del grupo BIO-278 liderado por el Dr. Juan Muñoz Blanco, el trabajo de investigación llamado “**Functional characterization of molecular regulatory mechanisms controlling the ripening in strawberry fruit**” 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 la Dra. Rosario Blanco Portales y el Dr. Francisco Javier Molina Hidalgo, 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 Gdo. Martínez Rivas, además de haber desarrollado un correcto aprendizaje en el laboratorio, que le 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 (5 meses en total) en el grupo de investigación dirigido por el Dr. Alisdair R. Fernie “Central Metabolism” del “Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology” en Potsdam, Alemania, donde se realizaron parte de los análisis presentados en la tesis, y donde el Gdo. Martínez Rivas se incorporará como investigador postdoctoral a la finalización de la tesis doctoral.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han estudiado varios genes, *FaPRE1*, *FaMYB123* y *FaCXE2* relacionados en el control del proceso de maduración, de la producción de antocianinas y flavonoles, y de la producción de compuestos volátiles, respectivamente. También, se describe como el cambio en el patrón de metilación afecta al normal desarrollo del proceso de maduración. El hecho de que este trabajo esté estrechamente relacionado con el esclarecimiento de los procesos moleculares implicados en el control de la maduración del fruto de fresa lo hace especialmente interesante desde el punto de vista biotecnológico. Los resultados obtenidos por el Gdo. Martínez Rivas, e incluidos en esta tesis doctoral dentro del trabajo realizado en el grupo BIO-278 y en colaboración con grupos de la Universidad de Málaga y con el grupo del Dr. Fernie, han dado lugar a 13 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, incluida la obtención de un premio a mejor comunicación oral y a 3 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 Gdo. Martínez Rivas 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, Lekhbou 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.

**“Wide genomic analysis of NAC proteins involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria vesca*)”**

**Martínez-Rivas FJ**, Moyano E, Molina-Hidalgo FJ, Ric-Varas P, Matas AJ, Caballero Repullo JL, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A.

5th Plant Genomics & Gene Editing Congress. Ámsterdam, Países Bajos, Marzo 2017.

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

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

5th Plant Genomics & Gene Editing Congress. Ámsterdam, Países Bajos, Marzo 2017.

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

Higuera JJ, Molina-Hidalgo FJ, Garrido-Gala J, Blanco-Portales R, **Martínez-Rivas FJ**, Codesido V, Lekhbou A, Jiménez-Pastor FJ, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Caballero-Repullo JL, Muñoz-Blanco J.

VIII Jornadas de divulgación de la investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. Córdoba, España. Junio, 2018.

**“WBGs analysis of m5C-methylation throughout the ripening of *Fragaria vesca* fruits”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Moyano E, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A.

XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIV RBMP). Salamanca, España. Junio, 2018.

**“The characterization of two basic/helix-loop-helix transcription factors reveals genes involved in the ripening regulation in strawberry fruit receptacle”**

Molina-Hidalgo FJ, **Martínez-Rivas FJ**, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIV RBMP). Salamanca, España. Junio, 2018.

**“Methylation status governs strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Moyano E, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A.

XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIV RBMP). Salamanca, España. Junio, 2018.

**“Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of (*Fragaria × ananassa*) fruits”**

Ric-Varas P, **Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Matas AJ, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A, Moyano E.

XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIV RBMP). Salamanca, España. Junio, 2018.

**“El proceso de maduración de la fresa está regulado por patrones de metilación diferenciales”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Caballero Repullo JL, Moyano E, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A.

I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias. Almería, España. Diciembre, 2018. **Premio a mejor comunicación oral.**

**“Caracterización funcional de un factor de transcripción de tipo WRKY en el proceso de maduración del fruto de fresa”**

**Martínez-Rivas FJ**, Molina-Hidalgo FJ, Caballero Repullo JL, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

VII congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España. Febrero, 2019.

**“The characterization of two basic/helix-loop-helix transcription factors reveals genes involved in the ripening regulation in strawberry fruit receptacle”**

Molina-Hidalgo FJ, **Martínez-Rivas FJ**, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XIV RBMP). Salamanca, España. Junio, 2018.

**“The transcriptional co-activator FaBOP1 plays an important regulatory role in the strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening”**

Blanco-Portales R, **Martínez-Rivas FJ**, Molina-Hidalgo FJ, Moyano E, Caballero Repullo JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R.

XV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XV RBMP). Málaga, España. Noviembre, 2020.

**“The R2-R3 MYB transcription factor FaMYB123 regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Serratos M, Ric-Varas P, Medina-Puche L, Moyano L, Mercado JA, Alseekh S, Caballero Repullo JL, Rodríguez-Franco A, Fernie AR, Muñoz-Blanco J, Molina-Hidalgo FJ.

XV Reunión de Biología Molecular de Plantas (XV RBMP). Málaga, España. Noviembre, 2020.

Los artículos de investigación publicados son:

**“Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of the *Fragaria × ananassa* fruits”**

Moyano E, **Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Ric-Varas P, Matas AJ, Caballero JL, Muñoz Blanco J, Rodríguez Franco A. 2018. Plos One, DOI: 10.1371/journal.pone.0196953.

Impact factor: 2.776

**“An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle”**

Medina-Puche L\*, **Martínez-Rivas FJ\***, Molina-Hidalgo FJ\*, Mercado JA, Moyano E, Rodríguez Franco A, Caballero JL, Muñoz Blanco J, Blanco-Portales R. 2019. BMC Plant Biology. DOI: 10.1186/s12870-019-2092-4. \*Those authors contribute equally to this work.

Impact factor: 3.670

**“Ectopic expression of the atypical HLH *FaPRE1* gene determines changes in cell size and morphology”**

Medina-Puche L, **Martínez-Rivas FJ**, Molina-Hidalgo FJ, García-Gago JA, Mercado JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2021. Plant Science. DOI: 10.1016/j.plantsci.2021.110830.

Impact factor: 3.591

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

**“The R2R3-MYB transcription factor *FaMYB123* regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Serratos MP, Ric-Varas P, Medina-Puche L, Moyano L, Mercado JA, Alseekh S, Caballero JL, Rodríguez-Franco A, Fernie AR, Muñoz-Blanco J, Molina-Hidalgo FJ. 2021.

**“Azacitidine treatment provides evidence that DNA methylation governs strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Caballero JL, Perez de Souza L, Alseekh S, Fernie AR, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A. 2021.

**“A novel carboxylesterase is involved in volatile production in strawberry fruit”**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Caballero JL, Alseekh S, Fernie AR, Schawb W, Muñoz-Blanco J, Molina-Hidalgo FJ. 2021.

**“Functional characterization of *FaWRKY71*, a novel WRKY transcription factor related with biotic and abiotic resistance”**

**Martínez Rivas FJ**, Molina-Hidalgo FJ, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2021

**“Whole bisulfite analysis throughout *Fragaria vesca* ripening process”**

**Martínez Rivas FJ**, Molina-Hidalgo FJ, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R, Rodríguez Franco A. 2021

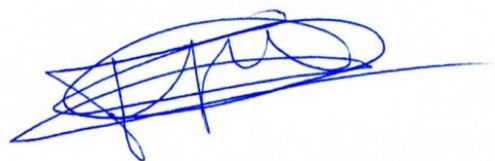
Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, 15 de febrero de 2021

Firma de los directores

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Rosario Blanco Portales', written in a cursive style.

Dra. Rosario Blanco Portales

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Francisco Javier Molina Hidalgo', written in a cursive style.

Dr. Francisco Javier Molina Hidalgo





**A mis padres**



Sine agricultura nihil  
Sin agricultura nada  
**Columela**

La historia es nuestra  
y la hacen los pueblos  
**Salvador Allende**

Una vez terminada esta etapa, quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado en este camino y que me han ayudado a transitarlo con mayor facilidad.

En primer lugar, quiero agradecer a los directores de esta tesis por todo lo que he aprendido de ellos, tanto a nivel científico como personal. A Charo, por confiar en mi hace ya unos años para realizar la tesis, y por su dedicación en este trabajo. A Javi, por su ayuda, su paciencia y por todo lo compartido juntos en el laboratorio, aunque a veces me lleve la contraria solo por el placer de discutir. También quiero agradecer a Juan por abrirme las puertas del laboratorio, por guiarme a lo largo de estos años y darme la oportunidad de formarme como científico.

Al resto del grupo BIO-278 y a todas las personas que han formado parte de él a lo largo de estos años. A Enri, José Luis y Antonio cuyos consejos y charlas me han servido tanto. A José Javier, por todos los cafés compartidos y porque siempre ha estado ahí para ayudarme en cualquier duda, y si no sabía la respuesta, no paraba hasta encontrarla. A Pepe, Fran Pastor, Ana, Vicky y Ayman, por haber formado una pequeña familia que siempre ha estado apoyándome y haciendo más divertido el trabajo. También al grupo de la Universidad de Málaga dirigido por José Ángel Mercado y Fernando Pliego y a sus componentes, Antonio, Pablo, Gloria... Gran parte del trabajo es gracias a vuestra ayuda.

A los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de los que siempre he tenido su apoyo en lo que he necesitado, así como a su equipo de dirección que siempre ha estado dispuesto a ayudar en todo lo necesario. A las *secres* Inés, Julia, Susana, Conchi y Zaira, por estar siempre ahí para cualquier duda administrativa y asegurarse de que todo esté perfecto. Mil gracias. En especial gracias al grupo de Jesús Jorrín y sus componentes: Rosa, Lola, M<sup>o</sup> Ángeles, Bonoso, Anita, Cristina, Patricia, Mónica, Leti... Tanto por la ayuda en aquello que nos faltaba, o el espacio en los congeladores, como por acogerme como uno más en tantos y tan buenos momentos compartidos. A Nieves Abril, por acogerme como alumno interno cuando era alumno de *primerillo* y junto a Carmen Pueyo y Juan López Barea, mostrarme el amor a la ciencia.

To *meine lieben Freunde von AG Fernie*. To Ally Fernie, who had no doubt in accepting me for not one but two shorts stays, and to Saleh Alseekh for teaching and supervising me during both stays at MPIMP Golm. To Gini, for each coffee break we spent together. To all the members of AG Fernie (Laise, David, Leo, Micha, Thomas, Mustafa...) for treating me as one of you while I was there. Y al gran grupo de españoles y asociados que lo hicieron todo mucho más fácil: Norma, Sara, Itzell, Dionis, Pablo Lucio... *Danke schön!*

A mi familia. A mis padres José Antonio y Clara, a mi hermano, Emilio. Gracias por darlo siempre todo por mí. Gracias por vuestra confianza y cariño. Vosotros sois el ejemplo del trabajo y del esfuerzo diario, siempre os habéis dejado la piel para que nunca me faltase de nada, ni en los peores momentos. Estoy muy orgulloso de los valores que me habéis enseñado, y si soy quien soy, es gracias a vosotros. A mis tíos, o mis *cuñaos*, Dulce y Marcelino. Gracias por cuidarme en los momentos más duros. A mi abuela Dulce, mi tío Félix y a mis primos, Marce y Melanie, por todos los momentos que hemos pasado juntos, os quiero. Jamás me olvidaré de mis abuelos Isabel, Emilio y Félix, que nos dejaron demasiado pronto, y con quienes me hubiera encantado compartir este momento.

Se dice que los amigos son la familia que se elige. Yo tengo la suerte de tener una segunda familia increíble y cuyo apoyo he sentido durante este duro camino. A mis *Anas*, cuya visita no podía faltar en cada viaje a Roquetas. Ana Cristina por tantos años juntos. Gracias por estar siempre ahí, por todas las visitas que me has hecho, tanto en Córdoba como en Berlín y por todos los buenos ratos juntos. A Ana Tomé, que siempre tenía un plan para desconectar, y siempre preocupada por cómo me estaba yendo. Gracias por todo.

A mis niñas, Bea, Eli y Majo. Sois lo mejor que me ha dejado el paso por la universidad. Por todos los esfuerzos que hemos hecho por vernos siempre que hemos podido y por todo vuestro apoyo. Gracias por estar ahí siempre. A *la Navarro*, por todo lo que hemos compartido viviendo juntos, por esas risillas en el sofá viendo la tele y esos momentos duros en los que siempre hemos sabido apoyarnos. A Sandra, que siempre ha estado ahí para desahogarme. Gracias por esos momentos de “gimnasio” los viernes por la tarde y por tantos y tantos cafés que han servido de terapia para desconectar, “o denunciamos a todo el mundo o nos llamamos aporreando la pared, tú decides”. A Casi, por todo el tiempo compartido en la universidad y fuera de ella, y por todas las veces que hemos arreglado el mundo en la mesa de un bar; siempre hay una salida, amigo.

Al resto de compañeros que me han acompañado durante estos años. A las niñas de Biología Celular: Elena, Lucía, Sara y Luzma, así como a Antonio Jesús, por adoptar a un bioquímico en Biología Celular y por los momentos de comidas y cafés compartidos. A Carmina, que siempre está dispuesta a ayudar en todo lo que pueda. A mis compañeros de IU Roquetas que, aunque nos veamos de tanto en cuando siempre me han apoyado: Juan Pablo, Belén, Sensi... gracias por todo lo que me habéis enseñado. A Marcos, por esas risas compartidas en este último año pandémico. A Cirenía, por ponerle esta preciosa portada a este trabajo.

Lo mejor es para el final, como el postre. A Diego, por haber sido mi pilar fundamental durante todos estos años. Por tu apoyo constante, por creer en mí más que yo mismo y por no dejarme caer en los momentos más difíciles. Gracias por hacerme ver que soy capaz de lo que me propongo. Gracias por entenderme en los peores momentos y por celebrar como tuyas mis victorias. Has caminado junto a mí estos años y lo que he conseguido es gracias a tí. Y, ¡el siguiente eres tú!

Seguramente me deje a muchas personas que me han acompañado a lo largo de estos cinco años, así que a la gente que me ha acompañado y ayudado, aunque ellos no lo sepan, ¡gracias!



**Table of contents**

<b>SUMMARY</b> .....	31
<b>RESUMEN</b> .....	41
<b>SUMMARY GENERAL INTRODUCTION</b> .....	49
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	56
1. La planta de fresa: generalidades.....	56
1.1. Origen, especiación y evolución.....	56
2. Citología y análisis filogenético .....	59
3. Morfología de la planta de fresa .....	61
3.1. Morfología del fruto: aquenios y receptáculo.....	63
4. Composición del fruto de fresa.....	63
5. Fisiología del fruto de fresa .....	66
5.1. Cambios macroscópicos .....	66
5.1.1. Crecimiento .....	66
5.1.2. Elongación.....	68
5.1.3. Maduración.....	68
5.2. Cambios microscópicos.....	73
5.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor .....	73
5.2.2. Metabolismo de los fenilpropanoides: aparición del color.....	79
5.3. Respiración .....	84
5.4. Choque oxidativo.....	85
6. Control de la floración.....	86
7. Regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa.....	88
7.1. Auxinas.....	89
7.2. Giberelinas y citoquininas .....	90
7.3. Ácido abscísico.....	92
7.4. Etileno.....	93
7.5. Brasinoesteroides.....	95
8. Control epigenético de la maduración .....	95
9. Expresión génica durante el desarrollo y la maduración del fruto de fresa.....	97
10. Genes implicados en la mejora de fresa .....	104
10.1. Mejora de la planta de fresa frente a plagas y enfermedades .....	104
10.1.1. Resistencia a agentes abióticos.....	104
10.1.2. Resistencia a agentes bióticos .....	108
10.2. Mejora de la floración y fructificación de la planta de fresa .....	112

10.3. Mejora de la calidad del fruto de fresa mediante la modificación de sus propiedades organolépticas.....	113
10.3.1. Manipulación del proceso de reblandecimiento .....	113
10.3.2. Mejora de las propiedades organolépticas.....	116
11. Alérgenos de la fresa .....	118
12. Importancia económica del fruto de fresa .....	119
<b>OBJECTIVES</b> .....	151
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	155
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	157
1. MATERIALES.....	157
1.1. Material químico .....	157
1.1.1. Productos químicos .....	157
1.1.2. Antibióticos utilizados.....	161
1.1.3. Kits de biología molecular.....	161
1.2. Material biológico .....	162
1.2.1. Material vegetal .....	162
1.2.2. Estirpes bacterianas .....	163
1.2.3. Estirpes de levaduras .....	164
1.3. Vectores de clonación.....	164
1.3.1. Vectores de expresión de proteínas .....	166
1.3.2. Vectores binarios .....	169
2. MÉTODOS.....	172
2.1. Condiciones de cultivo de las estirpes bacterianas.....	172
2.2. Condiciones de cultivo de las estirpes de levaduras.....	173
2.3. Obtención de células competentes y transformación de bacterias .....	173
2.3.1. Preparación de células competentes permanentes de <i>E. coli</i> .....	173
2.3.2. Transformación de células de <i>E. coli</i> químicamente competentes.....	174
2.3.3. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 y AGL0. ....	175
2.3.4. Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> químicamente competentes .....	175
2.3.5. Selección de transformantes bacterianos positivos .....	175
2.3.6. Identificación de transformantes positivos.....	176
2.4. Obtención de células competentes y transformación de levaduras .....	177
2.4.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	177
2.4.2. Selección por aminoácidos .....	177
2.5. Manipulación de moléculas de ADN .....	177
2.5.1. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN.....	177
2.5.2. Purificación de fragmentos de ADN .....	180



2.5.3. Concentración de muestras de ADN .....	180
2.5.4. Digestión de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción.....	181
2.5.5. Ligación de moléculas de ADN.....	181
2.5.6. Secuenciación .....	182
2.6. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	183
2.6.1. Extracción de ARN.....	183
2.6.2. Obtención y purificación de ARN .....	183
2.6.3. Extracción de ADN plasmídico .....	185
2.6.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	185
2.7. Separación electroforética de ácidos nucleicos .....	186
2.7.1. Electroforesis de ADN.....	186
2.7.2. Electroforesis de ARN.....	186
2.8. Estudios de expresión génica.....	187
2.8.1. Tratamiento del ARN con <i>DNase</i> I .....	187
2.8.2. Comprobación de la pureza del ARN total.....	188
2.8.3. RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	188
2.8.4. Reacción de retrotranscripción .....	189
2.8.5. Análisis de los datos .....	192
2.8.6. Generación y análisis de <i>microarray</i> .....	192
2.8.7. Estudios de RNA-Seq y análisis de genes diferencialmente expresados. ..	194
2.8.8. Anotación de secuencias.....	194
2.9. Generación de plantas transgénicas .....	195
2.9.1. Introducción a la metodología <i>Gateway</i> .....	195
2.9.2. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen <sup>TM</sup> ) .....	195
2.9.3. Principios básicos de la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	197
2.9.4. Transformación estable de plantas de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Chandler” ..	198
2.10. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Elsanta” .....	202
2.10.1. Obtención y mantenimiento de plantas de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Elsanta” .....	202
2.10.2. Transformación transitoria de frutos de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Elsanta” a través de agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i> AGL0 .....	202
2.11. Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> a través de agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i> GV3101 .....	203
2.12. Interacción mediante doble híbrido en levadura.....	205
2.12.1. Ensayos de auto-activación .....	205
2.13. Tratamientos hormonales en frutos y plantas .....	206

2.13.1. Retirada de aquenios y tratamiento con auxinas .....	206
2.13.2. Tratamiento con NDGA .....	206
2.13.3. Tratamiento de estrés hídrico .....	207
2.13.4. Tratamiento con 5-azacitidina .....	207
2.13.5. Tratamientos con giberelinas y paclobutrazol .....	208
2.14. Extracción de metabolitos y hormonas del fruto de fresa .....	208
2.14.1. Extracción de metabolitos .....	208
2.14.2. Extracción de ABA.....	210
2.14.3. Extracción y análisis de hormonas .....	211
2.15. Extracción de proteínas y análisis enzimáticos .....	211
2.15.1. Extracción de proteínas .....	211
2.15.2. Análisis enzimático y cinético de la proteína recombinante FaCXE .....	212
2.16. Análisis estadístico de los datos .....	213
CHAPTER 1 .....	219
An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle .....	219
Abstract.....	221
Introduction .....	221
Results .....	224
<i>FaPRE</i> genes encode atypical HLH proteins .....	224
<i>FaPRE1</i> protein is located in nucleus .....	227
The spatio-temporal expression of <i>FaPRE</i> genes indicates that <i>FaPRE1</i> is a ripening-related gene.....	228
Hormonal regulation of <i>FaPRE</i> genes transcription .....	229
High-throughput transcriptional analysis of transgenic receptacle where the <i>FaPRE1</i> transcription was silenced.....	232
Discussion.....	235
<i>FaPRE1</i> and fruit ripening .....	236
Conclusions .....	241
Methods .....	241
Plant material.....	241
Hormonal treatments .....	241
Quantification of abscisic acid content.....	242
Bioinformatic resources.....	242
Generation of RNAi constructs and transfection of strawberry fruits by agroinfiltration .....	243
Subcellular localization analysis .....	243
RNA isolation.....	244

Microarray generation and analysis.....	244
Validation of microarray data and expression analysis by quantitative real-time PCR .....	245
CHAPTER 2 .....	255
The R2R3-MYB transcription factor FaMYB123 regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit .....	255
Abstract.....	257
Introduction .....	258
Results .....	260
Sequence and phylogenetic analysis of the FaMYB123 .....	261
FaMYB123 protein is located in the nucleus .....	263
<i>FaMYB123</i> expression is strongly expressed in receptacles and hormonally regulated throughout the fruit growth and ripening .....	264
Expression analysis shows that FaMYB123 is a regulator of the anthocyanin biosynthesis pathway.....	267
Metabolite analysis of FaMYB123-RNAi transgenic fruits.....	269
FaMYB123 interacts with FabHLH3, a flavonoid related TF.....	271
Discussion.....	273
FaMYB123, a MYB-like TF is ripening-related and hormonally regulated.....	273
FaMYB123 partially regulates anthocyanin and flavonol metabolic pathways.....	274
FaMYB123 interacts with FabHLH3 in the nucleus .....	276
Material and methods .....	280
Plant Material and RNA isolation .....	280
Hormone treatments .....	280
Analysis of nucleotide and deduced amino acid sequence of FaMYB123 gene.....	281
Generation of FaMYB123-RNAi construct and silencing of FaMYB123 expression in strawberry plants .....	281
Expression analysis by quantitative real-time PCR.....	282
Total anthocyanin analysis .....	283
Metabolite extraction, HPLC analysis and identification.....	283
Cloning the full-length sequence of FaMYB123 and subcellular location of the protein coded.....	284
Yeast-two-hybrid interaction studies.....	284
Bimolecular fluorescence complementation assay .....	285
CHAPTER 3 .....	293
Azacididine treatment provides evidence that DNA methylation governs strawberry ( <i>Fragaria x ananassa</i> ) fruit ripening.....	293
Introduction .....	296
Results .....	299

5-azacytidine delayed strawberry ripening promoting changes in transcriptome ....	299
AZA treatment blocks anthocyanin biosynthesis. ....	299
AZA treatments alter the expression of transcription factors regulating the strawberry ripening process.....	300
AZA alters organoleptic related genes .....	301
AZA altered key genes involved in the biosynthesis of hormones .....	302
Metabolic analysis shows differences between treated and non-treated part.....	304
Effects of AZA in secondary metabolism .....	305
AZA treatment alters hormone contents.....	306
Discussion.....	308
A global demethylation mediated by AZA delay strawberry fruit ripening.....	308
Material and methods .....	313
Plant material.....	313
5-azacytidine treatments .....	314
RNA extraction.....	314
RNA-Seq and analysis of differentially expressed genes (DEGs) .....	314
Metabolites and Hormones determination.....	315
Primary metabolite determination .....	315
Secondary metabolites determination.....	315
Hormone determination.....	316
CHAPTER 4.....	327
A novel carboxylesterase is involved in volatile production in strawberry fruit .....	327
Introduction .....	329
Results .....	331
Bioinformatics and phylogenetics analysis of the <i>FaCXE2</i> gene and protein .....	331
Spatio-temporal expression profile of <i>FaCXE2</i> gene.....	334
<i>FaCXE2</i> gene expression is hormonally regulated by auxins and ABA.....	335
Subcellular location of <i>FaCXE2</i> protein .....	337
Enzymic characterization of the <i>FaCXE2</i> protein expressed in <i>E. coli</i> .....	338
Catalytic Properties .....	339
Effect of Time, Enzyme Concentration and Substrate Specificity .....	339
Influence of pH and Temperature on the Activity of Purified Esterase .....	340
Km and Vmax.....	341
Transient silencing of <i>FaCXE2</i> alters volatile content.....	341
Discussion.....	344
<i>FaCXE2</i> is a receptacle specific gene and hormones regulate its expression .....	345
Subcellular localization .....	346

Recombinant FaCXE2 .....	346
FaCXE2 has a role on volatile production in strawberry .....	347
Conclusions .....	347
Materials and methods.....	348
Plant material.....	348
Hormone related experiments.....	348
Preparation of deuterated abscisic acid, ABA extraction procedure and HPLC-MS conditions .....	349
RNA isolation.....	349
Expression analysis by quantitative real time PCR (qRT-PCR) .....	349
Generation of RNAi constructs and transfection of strawberry fruit by agroinfiltration.....	350
Bioinformatics sequence analysis.....	350
Subcellular location .....	351
Cloning of full-length cDNA of <i>FaCXE2</i> .....	352
Expression of recombinant FaCXE2 protein in <i>Escherichia coli</i> .....	352
Enzyme Assay .....	352
Kinetic Studies.....	353
Volatile extraction and identification .....	354
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>361</b>



<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>1-NAA</b>	ácido 1-naftalenacético / 1-naphthaleneacetic acid	
<b>4CL</b>	<i>p</i> -cumarato:CoA ligasa / <i>p</i> -coumarate:CoA ligase	<i>Fa4CL</i>
<b>Aa</b>	aminoácido / amino acid	
<b>AAT</b>	alcohol acil transferasa / alcohol acyltransferase	<i>FaAAT1</i> ; <i>FaAAT2</i> ; <i>FaSAAT</i>
<b>ABA</b>	ácido abscísico / abscisic acid	
<b>ABP1</b>	proteína de unión a auxinas 1 / auxin-binding protein 1	<i>FaABP1</i>
<b>ACC</b>	1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa / 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	
<b>ACO</b>	ACC oxidasa / ACC oxidase	<i>FaACO1</i>
<b>ADH</b>	alcohol deshidrogenasa / alcohol dehydrogenase	
<b>ADN/DNA</b>	ácido desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid	
<b>ADNasa / DNAsa</b>	desoxirribonucleasa / deoxyribonuclease	
<b>ADNc/ cDNA</b>	ácido dexorribonucleico copia / deoxyribonucleic acid copy	
<b>ADNcp/ cpDNA</b>	ácido desoxirribonucleico del cloroplasto / chloroplast deoxyribonucleic acid	
<b>ADNcs/ ssDNA</b>	ácido desoxirribonucleico de cadena simple / single strand deoxyribonucleic acid	
<b>ADNdc/ dsDNA</b>	ácido desoxirribonucleico de doble cadena / double strand deoxyribonucleic acid	
<b>AG</b>	AGAMOUS	<i>FaAG1</i>
<b>AGPasa</b>	ADP-glucosa pirofosforilasa / ADP-glucose pyrophosphorylase	
<b>ANR</b>	antocianidin reductasa / anthocyanidin reductase	<i>FaANR</i>
<b>ANS/ LDOX</b>	antocianidin sintasa; leucoantocianidin dioxygenasa / anthocyanidin synthase; leucoantocianidin dioxygenase	<i>FaANS</i>
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico / ribonucleic acid	
<b>ARNasa/ RNAsa</b>	ribonucleasa / ribonuclease	
<b>ARNi/ RNAi</b>	ácido ribonucleico interferente / interfering ribonucleic acid	
<b>ARNm/ RNAm</b>	ácido ribonucleico mensajero / messenger ribonucleic acid	
<b>ARNr/ RNAr</b>	ácido ribonucleico ribosómico / ribosomal ribonucleic acid	
<b>AZA</b>	5 azacitidina / 5 azacytidine	
<b>BA</b>	N <sup>6</sup> -benciladenina / N <sup>6</sup> -benzyladenine	
<b>bHLH</b>	basic helix-loop-helix	
<b>BL</b>	brasinólido / brassinolide	
<b>BRs</b>	brasinoesteroides / brassinosteroids	
<b>C4H</b>	ácido cinámico 4-hidroxilasa / cinnamic acid 4-hydroxylase	<i>FaC4H</i>
<b>CAD</b>	cinamil alcohol deshidrogenasa / cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Facad</i> ; <i>FaCAD1</i>
<b>CBF1</b>	factor de unión CRT/DRE / CRT/DRE binding factor 1	<i>FaCBF1</i>
<b>CCR</b>	cinamoil CoA-reductasa / cinnamoyl CoA reductase	<i>Faccr</i> ; <i>FaCCR</i>
<b>CDPK</b>	proteína quinasa calcio-dependiente / calcium-dependent protein kinase	<i>FaCDPK1</i>
<b>Cel</b>	celulasa / cellulase	<i>FaCell</i>
<b>CHI</b>	chalcona isomerasa / chalcone isomerase	<i>FaCHI</i>
<b>CHR</b>	chalcona reductasa / chalcone reductase	<i>FaCHR</i>
<b>CHS</b>	chalcona sintasa / chalcone synthase	<i>FaCHS</i>
	(table continues on following page)	

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>CoA</b>	coenzima A / coenzyme A	
<b>COV/ VOC</b>	compuestos orgánicos volátiles / volatile organic compounds	
<b>CS</b>	catasterona / catasterone	
<b>Ct</b>	ciclo umbral / threshold cycle	
<b>cv.</b>	cultivar	
<b>Da</b>	Dalton	
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato / diethyl pyrocarbonate	
<b>DFR</b>	dihidroflavonol reductasa / dihydroflavonol reductase	<i>FaDFR</i>
<b>D-Glu-6-P</b>	D-glucosa-6-fosfato / D-glucose-6-phosphate	
<b>DMMF</b>	2,5-dietil-4-metoxi-3(2H)-furanona / 2,5-diethyl-4-metoxi-3 (2H)-furanone	
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido / dimethyl sulfoxide	
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos / deoxyribonucleotides	
<b>DO</b>	densidad óptica / absorbance	
<b>DTT</b>	ditiotreitol / dithiothreitol	
<b>EBGs</b>	genes tempranos reguladores de la biosíntesis del metabolismo de flavonoides/fenilpropanoides / early regulated biosynthesis genes	
<b>EG</b>	endoglucanasa / endoglucanase	<i>FaEG</i>
<b>ERF</b>	elementos de respuesta al etileno / ethylene response elements	
<b>ESTs</b>	secuencia de ADNc expresada / expressed sequence tag	
<b>EXP</b>	expansina / expansin	<i>FaExp</i>
<b>F3H</b>	flavonoide 3-hidroxilasa / flavonoid 3-hydroxylase	<i>FaF3H</i>
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Food and Agriculture Organization of the United Nations	
<b>Fcor</b>	Fragaria regulada por frío / Fragaria cold-regulated	<i>Fcor1, Fcor2</i>
<b>Fig.</b>	figura / figure	
<b>FISH</b>	hibridación <i>in situ</i> fluorescente / fluorescence <i>in situ</i> hybridization	
<b>FK</b>	fructoquinasa / fructokinase	
<b>FLS</b>	flavonol sintasa / flavonol synthase	
<b>FT/TF</b>	factor de transcripción / transcription factor	
<b>GalUA</b>	ácido galacturónico / galacturonic acid	
<b>Gas</b>	giberelinas / gibberellins	
<b>GAST</b>	Transcrito estimulado por GA / GA-stimulated transcript	<i>FaGAST1; FaGAST2</i>
<b>GC-MS</b>	cromatografía de gases-espectrometría de masas / gas chromatography-mass spectrometry	
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente / green fluorescent protein	
<b>GST</b>	glutación S-transferasa / glutathione S-transferase	
<b>HDMF</b>	4-hydroxy-2,5-dimetil-3(2H)-furanona / 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H)-furanone (furaneol)	
<b>HGA</b>	homogalacturonanos / homogalacturonan	
<b>HK</b>	hexoquinasa / hexokinase	
<b>HPLC-MS</b>	cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas / high performance liquid chromatography-mass spectrometry	
<b>HSP</b>	proteínas de choque térmico / heat shock protein	<i>HSP</i>

*(table continues on following page)*



<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>HyPRP</b>	híbrido proteína rica en prolina / hybrid proline-rich protein	<i>FaHyPRP</i>
<b>IAA</b>	ácido 3-indol acético / 3-indole acetic acid	
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E / immunoglobulin E	
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-galactósido / isopropyl- $\beta$ -D-galactoside	
<b>ITS</b>	espaciadores de transcripción interna / internal transcribed spacer	
<b>Kb</b>	kilobase	
<b>LAGs</b>	genes tardíos reguladores de la biosíntesis del metabolismo de flavonoides/fenilpropanoides / late-regulated biosynthesis genes	
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-Bertani / culture medium Luria-Bertani	
<b>LC-MS</b>	cromatografía líquida-espectrometría de masas / liquid chromatography–mass spectrometry	
<b>LTP</b>	proteína de transferencia de lípidos / lipid transfer protein	<i>Faltp; FaLTP</i>
<b>MMA</b>	Sales de Murashige y Skoog, morfolina ácido etanosulfónico y acetosiryngona / Murashige and Skoog salts, morpholine ethanesulfonic acid and acetosiryngone	
<b>MS</b>	medio de cultivo Murashige y Skoog / culture medium Murashige and Skoog	
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida / reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
<b>MSTFA</b>	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología / National Center for Biotechnology Information	
<b>NCED</b>	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa / 9- <i>cis</i> -dioxxygenase epoxicarotenoide	<i>FaNCED1</i>
<b>NDGA</b>	ácido nordihidroguaiarético / nordihydroguaiaretic acid	
<b>NES1</b>	nerolidol sintasa 1 / nerolidol synthase 1	<i>FaNES1</i>
<b>NPR</b>	non expressor of pathogenesis related	
<b>nptII</b>	neomicina fosfotransferasa II / neomycin phosphotransferase II	
<b>OGA</b>	derivados pectínicos oligogalacturónidos / derivatives pectinic oligogalacturonides	
<b>OLP</b>	proteína de tipo osmotina / osmotin like protein	<i>OLP2</i>
<b>OMT</b>	O-metil transferasa / O-methyl transferase	<i>FaOMT</i>
<b>ORF</b>	marco abierto de lectura / open reading frame	
<b>PA; Pas</b>	proantocianidinas / proanthocyanidins	
<b>PAC</b>	paclobutrazol	
<b>PAL</b>	fenilalanina amonio-liasa / phenylalanine ammonia lyase	<i>FaPAL</i>
<b>pb/bp</b>	pares de bases / base pairs	
<b>PcF</b>	péptido fitotóxico extracelular / extracellular phytotoxic peptide	
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa / chain reaction polymerase	
<b>PDC</b>	piruvato descarboxilasa / pyruvate decarboxylase	<i>FaPDC1</i>
<b>PE</b>	pectín metilesterasa / pectin methylesterase	<i>FaPE1-FaPE4</i>
<b>PG</b>	poligalacturonasa / polygalacturonase	<i>FaPG</i>
<b>PGIP</b>	polygalacturonase-inhibiting protein / polygalacturonase-inhibiting protein	<i>PGIP</i>
<b>PINS</b>	sintasa pineno / pinene synthase	<i>FvPINS</i>
<b>PIP</b>	proteínas intrínsecas de la membrana plasmática / plasma membrane intrinsic proteins	<i>FaPIP1;1, FaPIP2;1</i>
<b>PL</b>	pectato liasa / pectate lyase	<i>FaPL</i>
<b>PRs</b>	genes relacionados con la patogénesis / pathogenesis-related genes	<i>FaPR</i>

(table continues on following page)

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>PMSR</b>	metionina sulfóxido reductasa / methionine sulfoxide reductase	<i>Fapmsr</i> ; <i>FaPMSR</i>
<b>PRE</b>	resistente a paclobutrazol / paclobutrazol resistant	<i>FaPRE1</i>
<b>PRX</b>	peroxidasa / peroxidase	<i>FaPRX27</i>
<b>QR</b>	quinona reductasa / quinone reductase	<i>FaQR</i>
<b>qRTPCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real / quantitative real time PCR	
<b>QTL</b>	locus de un carácter cuantitativo / quantitative trait locus	
<b>RG-I</b>	ramnogalacturonanos I / rhamnogalacturonan I	
<b>RG-II</b>	ramnogalacturonanos II / rhamnogalacturonan II	
<b>RGlyase</b>	ramnogalacturonato liasa / rhamnogalacturonate lyase	<i>FaRGlyase1</i>
<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno / reactive oxygen species	
<b>Rpm</b>	revoluciones por minuto / revolutions per minute	
<b>RT</b>	reacción de retrotranscripción / reverse transcription reaction	
<b>S6PDH</b>	sorbitol deshidrogenasa-6-fosfato / sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	<i>FaS6PDH</i>
<b>SCAI</b>	Servicio Central de Apoyo a la Investigación / Central Service for Research Support	
<b>SDH</b>	sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente / sorbitol dehydrogenase NAD-dependent	<i>FaSDH</i>
<b>SDS</b>	duodecil sulfato sódico / sodium dodecyl sulfate	
<b>sp.</b>	especie / species	
<b>spp.</b>	subespecie / subspecies	
<b>SPS</b>	sacarosa fosfato sintasa / sucrose phosphate synthase	
<b>SS</b>	sacarosa sintasa / sucrose synthase	
<b>TBE</b>	tampón Tris-bórico-EDTA-Na <sub>2</sub> / Tris-borate-EDTA-Na <sub>2</sub>	
<b>T-DNA</b>	ADN transferido / transfer DNA	
<b>TE</b>	tampón Tris-EDTA-Na <sub>2</sub> / Tris-EDTA-Na <sub>2</sub>	
<b>Tm</b>	temperatura de fusión / melting temperature	
<b>UFGT</b>	UDP-glucosa:flavonoide-3-O-glucosiltransferasa / UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase	<i>FaUFGT</i>
<b>UV</b>	radiación ultravioleta / ultraviolet radiation	
<b>Wt</b>	planta silvestre / wild type	
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -galactósido / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -galactoside	
<b>Xyl</b>	xilosidasa / xylosidase	<i>FaXyl</i>

## **SUMMARY**

## SUMMARY

**SUMMARY****“Functional characterization of molecular regulatory mechanisms controlling the ripening in strawberry fruit”**

Along the development of this thesis, I have studied the different molecular mechanisms that regulate the ripening process in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. Transcriptomic analysis performed in our research group allowed us to identify several transcription factors (TFs) and regulatory proteins up-regulated along the ripening process. Moreover, those genes identified present a clear hormonal regulation suggesting that they are involved in the regulation of physiological pathways that contribute to modulate the final organoleptic properties of the fruit.

Among those genes, highlights *FaPRE1*, a ripening related gene that encode an atypical HLH protein with high sequence homology with PACLOBUTRAZOL RESISTANCE (PRE) genes. bHLH TFs contain two clearly differentiated domains, a basic domain located at the amino terminus of the proteins, which contains 13-17 basic amino acids, and a HLH region, located at the carboxy terminus, that comprises two amphipathic  $\alpha$ -helices which are rich in hydrophobic amino acids and are connected by a loop of variable length. Meanwhile, HLH proteins lack sequences needed for DNA binding and, in consequence, they did not present DNA-binding ability. PRE genes are atypical bHLH proteins characterized by the lack of their DNA-binding domain, thus they need to interact with other proteins to modulate the expression of other genes.

In our work, we identified three *PRE* genes in strawberry genome that present more than 90% of homology in the aminoacidic sequence. Their transcriptional profile reveals that, while *FaPRE2* and *3* have their expression restricted to the vegetative tissues, *FaPRE1* is induced along the ripening process, presenting null expression in vegetative tissues. Moreover, *FaPRE1* expression is positively regulated by ABA and negatively by auxins, while gibberellins have no role in its expression. *FaPRE1* present ABA responsive sequences in its promoter, but no gibberellin sequences are found. This might explain the hormonal transcriptional response of this gene. *FaPRE1* expression was transiently down-regulated injecting *Agrobacterium* cells harboring RNAi construction into fruit receptacles. Those receptacles that presented higher silencing degree were

selected for further transcriptomic studies. The silenced fruits did not present any phenotypic changes, but microarray analysis showed 227 genes down-regulated and 276 up-regulated comparing with control. Among the down-regulated genes, 70% were ripening related while, in the up-regulated genes, 76% were overexpressed in immature receptacles. Those transcriptomic analysis support an important role of FaPRE1 which antagonistically coordinated the transcription of genes related to both receptacle growth and ripening. Thus FaPRE1, in ripened receptacle, represses the transcription of receptacle growth promoting genes while activating the transcription of those genes related to the receptacle ripening process.

Transcription factors are essential for gene expression regulation in plants. Thus, the next gene selected to be studied in our work was FaMYB123, a R2R3 MYB TF. These TFs are recognisable by their two imperfect MYB repeats that follow the R2 and R3 structure of the c-MYB proteins. To play its regulatory role, MYB TFs interact with other TFs and proteins involved in the transcription process by forming an MBW complex that regulate many metabolic and developmental pathways.

In our group, we have previously identified and characterised other MYB TF related with the control of key pathways in the ripening process, such as FaMYB10, a master regulator of the phenylpropanoid/anthocyanin pathway, and FaEOBII, regulator of eugenol production. In this work, we report that FaMYB123 is a MYB R2R3 that present the imperfect R2R3 domain in its sequence and is localized in the nucleus. The spatio-temporal expression pattern of *FaMYB123* reveal that it is ripening related and present low expression in vegetative tissues and achenes. Moreover, its expression is induced by ABA and repressed by auxins. These combined expression results indicate that *FaMYB123* mainly regulates specific ripening-related physiological processes in the fruit receptacle.

To further investigate the physiological role played by FaMYB123, we generated stable transgenics plants with the expression of *FaMYB123* knocked down by RNAi. Lines that present a higher degree of silencing were selected for further analysis ( $\geq 95\%$ ). Thus, expression analysis revealed a clear reduction of genes involved in anthocyanin biosynthesis. Those results were validated with metabolomic analysis that I performed in collaboration with the Alisdair Fernie lab in two shorts stays at the Max Planck Institute

of Molecular Plant Physiology (Potsdam, Germany). The metabolomic results revealed a disbalance between anthocyanins and proanthocyanins. While transgenics accumulated lower amounts of anthocyanins, as pelargonidin-3-glucose and its malonyl derivate, a higher accumulation of proanthocyanins were found in the transgenics receptacle, which are usually present at minor levels in ripe receptacles. Protein interaction studies revealed that FaMYB123 is able to bind to FabHLH3, a TF previously related to regulate proanthocyanin biosynthesis through the interaction with FaMYB9. This suggest that the complex FabHLH3-MYB9/123 could modulate the synthesis of pro- and anthocyanin. Molecular and physiological studies showed that this TF could be involved in the regulation of structural genes of the anthocyanins or flavonols that accumulate in ripen fruit receptacles.

Other regulatory mechanism of the gene expression is DNA methylation. Those epigenetics marks are usually tied to the silencing of genes, but lately there has been described that DNA methylation might be required for activating gene expression or to bind TFs at the promoter. Epigenetics marks are related to control ripening in different fruits, but is mainly described in tomato. DNA methylation patterns change dramatically after the application of either hyper- or hypo-methylating drugs. 5-Azacytidine (AZA) is a chemical able to induce a general and nonspecific DNA hypomethylation. It is added to DNA, acting as a cytosine analogue, and those bases are covalently bond to DNA methyltransferases which would be degraded thus losing methylation marks after rounds of DNA replication.

The application of AZA to halves of fruits results in an early ripening phenotype. However, when injected to strawberries white fruits, a complete stop of the ripening appears. RNA-seq studies determined that many TFs involved in the control of the ripening process are not induced in the treated. Many transcripts associated to hormone biosynthesis, aroma, flavor and texture were either reduced or not detected in the AZA treated parts. In the non-climateric strawberry fruit, the ripening is not controlled by ethylene but by the relation between ABA and auxins. After AZA treatment, key and critical genes pertaining to the ABA biosynthetic pathway were downregulated while, at the same time, those involved in its withdrawal are activated. Also, genes related with auxins and gibberellin biosynthesis are induced under AZA treatment. Moreover, metabolomic profile of AZA treated samples were similar to the white stages of ripening

rather to mature fruits. Null concentration of anthocyanin was found in treated parts while the hormonal profile was similar to the early stages of development. Lower concentration of bioactive ABA and higher amounts of the degradation products were found. Also, higher concentration of auxins and gibberellins were present in the treated part, suggesting a disbalance in hormonal content. AZA treatment led to a complete stop of the ripening process due to the alterations on the hormonal content that are able to alter the transcriptomic and metabolomic profiles. This work provides the basis revealing that methylation marks are needed for ripening in strawberry, but further works should be performed to fully understand this regulation.

The last gene selected was a carboxylesterase enzyme, *FaCXE2*. Carboxylesterases (CXE) are hydrolytic enzymes that belong to the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily of proteins. CXEs present a conserved catalytic triad, contained in the conserved sequence GX SXG, formed by the acidic amino acid serine and a histidine, and that constitutes the active site of these enzymes. In addition, these enzymes are related to play several roles in xenobiotic degradation, biotic stress responses as well as the volatile production.

Ripening in strawberry fruit is a complex process which carries out several changes in flavor, color taste and softening. In most fruits, as is the case with strawberry, the emission of volatiles begins and increases during ripening process. Only a few enzymes related with those processes have been described in strawberry. Two alcohol acetyltransferases (*FaAAT1* and *FaAAT2*) are related with volatile production but no CXE has been previously characterized in strawberry, leaving unknown the functional activities of those enzymes in this fruit. High-throughput transcriptomic analyses allowed us to identify *FaCXE2*, whose expression was ripening related, restricted to fruit tissues, as present high expression on receptacle and achenes, and hormonally regulated antagonistically by auxins and ABA. The subcellular localization studies revealed that this protein is located in the cytoplasm, similar to other volatile related enzymes as alcohol acyltransferases and other CXE. The recombinant protein was obtained its enzymatic properties were characterized. The optimal pH for its activity was 7.5 and its optimal temperature between 25-30°C. *FaCXE2* showed most affinity towards the longer chain esters.



In addition, the *FaCXE2* expression was transiently silenced in ripe strawberry receptacles by RNAi. Those receptacles with a higher silencing degree were selected for further volatile determination. Metabolomic studies revealed clear differences on ester content between transgenics and control fruit. Downregulation of *FaCXE2* resulted in a higher accumulation of different esters, while alcohol compounds were in lower concentration. Moreover, the *in vitro* activity of *FaCXE2* in hydrolyzing esters, together with the increase of esters *in vivo* caused by the knock down of *FaCXE2*, indicates that this CXE is a regulator of volatile ester content in strawberry.



**RESUMEN**



**RESUMEN****“Caracterización funcional de mecanismos reguladores de la maduración del fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*)”**

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se han estudiado algunos procesos que regulan el proceso de maduración del fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*). Análisis transcriptómicos masivos realizados previamente en nuestro grupo de investigación permitieron la identificación de varios factores de transcripción (FTs) y proteínas reguladoras inducidas durante la maduración del fruto de fresa. Se comprobó que la expresión de estos genes estaba regulada por hormonas, sugiriendo así, que pueden controlar diferentes procesos fisiológicos responsables de las características organolépticas del fruto maduro. Dentro de esos genes, se seleccionó a *FaPRE1* que codifica una proteína HLH atípica con alta homología de secuencia con genes de tipo *PACLOBUTRAZOL RESISTANCE* (PRE). Los FTs de tipo bHLH contienen dos dominios claramente diferenciados, uno básico localizado en el extremo amino de la proteína, que contiene entre 13 a 17 aminoácidos básicos, y una región HLH, localizada en el extremo carboxilo que contiene dos regiones  $\alpha$ -hélice anfipáticas ricas en aminoácidos hidrofóbicos. Las proteínas de tipo HLH carecen de las secuencias necesarias para la unión al ADN y, en consecuencia, no presentan esta habilidad. Así, los genes de tipo PRE codifican proteínas de la familia bHLH caracterizadas por la ausencia del dominio de unión al ADN y que, por lo tanto, necesitan de otras proteínas para modular la expresión de otros genes.

En este trabajo, se identificaron tres genes de tipo *PRE* en el genoma de fresa con más de un 90% de homología entre sus secuencias aminoacídicas. Sus perfiles transcriptómicos indicaron que, mientras *FaPRE2* y *3*, se expresaban exclusivamente en tejidos vegetativos, *FaPRE1* se inducía a lo largo de la maduración del fruto presentando una expresión muy baja en el resto de los tejidos analizados. Además, su expresión fue inducida por ABA, reprimida por auxinas (ambas hormonas relacionadas con el control de la maduración del fruto), y no se afectó por giberelinas. Este hecho se puede explicar

debido a la presencia de secuencias *cis* de respuesta a ABA y la ausencia de éstas para giberelinas en el promotor de *FaPRE1*.

Cuando la expresión de *FaPRE1* fue transitoriamente silenciada mediante la infiltración de *Agrobacterium* portando la construcción ARNi de este gen, no se observaron cambios fenotípicos que afectaran al proceso de maduración del fruto. No obstante, el estudio transcriptómico comparativo de frutos control y frutos transgénicos *FaPRE1*-ARNi reveló que 227 y 276 genes fueron silenciados y sobreexpresados respectivamente en estas condiciones experimentales. Del conjunto de genes silenciados, el 70% presentó un perfil de expresión relacionado con el proceso de maduración mientras que el 76% de los sobreexpresados mostraron un incremento de expresión en el estadio verde frente al rojo. Estos resultados indican que *FaPRE1* regula antagónicamente la expresión de genes relacionados con el desarrollo o la maduración del fruto rojo. Es decir, en el receptáculo maduro, *FaPRE1* reprime la expresión de genes relacionados con el desarrollo mientras que activa la expresión de otros relacionados con la maduración.

Los FTs son esenciales para la modulación de la expresión génica por ello, el FT de tipo R2R3 *FaMYB123* fue también seleccionado para su estudio en mayor profundidad. Este tipo de FTs se caracterizan por incluir dos repeticiones imperfectas de tipo MYB seguidas de la estructura R2-R3 de las proteínas c-MYB. Para llevar a cabo su función reguladora, interaccionan con otras proteínas formando complejos MBW que regulan múltiples rutas metabólicas y de desarrollo. Además, *FaMYB123* se localiza en el núcleo celular.

La expresión espacio temporal de *FaMYB123* indica que está asociado al proceso de maduración de la fresa y que su expresión es prácticamente específica de fruto, ya que presenta niveles de expresión muy bajos en aquenios y en otros tejidos vegetativos de la planta. Además, su expresión se induce por ABA y se reprime por auxinas, lo que sugiere que *FaMYB123* debe regular procesos relacionados con la maduración del fruto. Para comprender el papel regulador de este FT en fresa, se generaron plantas transgénicas estables con la expresión de *FaMYB123* silenciada (*FaMYB123*-ARNi). Aquellas líneas que presentaron los niveles de silenciamiento más altos ( $\geq 95\%$ ) fueron seleccionadas para realizar estudios metabolómicos y de expresión génica. Así, el análisis de expresión comparativo entre las líneas transgénicas *FaMYB123*-ARNi y las líneas control mostró

un claro silenciamiento de genes relacionados con la síntesis de antocianinas y flavonoides. Estos compuestos son sintetizados a lo largo de la maduración del fruto de fresa y son determinantes para la adquisición de las sus propiedades organolépticas características. Los resultados transcriptómicos obtenidos fueron validados posteriormente mediante el análisis metabolómico de las mismas muestras en colaboración con el grupo del Dr. Alisdair Fernie durante dos estancias predoctorales realizadas en el Max Planck Institute For Molecular Plant Physiology (Potsdam, Alemania).

En este sentido, los análisis metabolómicos realizados revelaron un desajuste en la concentración entre antocianinas y proantocianidinas. Así, mientras que los receptáculos de frutos transgénicos presentaban menor cantidad de antocianinas del tipo pelargonidina-3-glucósido y su derivado malonilo, sí acumulaban una mayor concentración de proantocianidinas, compuestos presentes predominantemente en frutos verdes de fresa y relacionados con sus etapas de desarrollo. Estudios de interacción de proteínas realizados demostraron que FaMYB123 interaccionaba con FabHLH3, un FT identificado como regulador de la síntesis de proantocianidinas mediante su unión con FaMYB9. Estos datos sugieren la posible regulación de la síntesis de antocianinas y proantocianidinas a través de la formación de un complejo FabHLH3-MYB9/123. Estudios moleculares y fisiológicos posteriores parecen indicar que FaMYB123 controla la expresión de genes relacionados con la síntesis de antocianinas y flavonoles, compuestos que normalmente se acumulan en receptáculos maduros.

La metilación del ADN es un mecanismo muy común de regulación de la expresión génica en plantas. Estas marcas epigenéticas han sido relacionadas con el silenciamiento de la expresión de aquellos genes que las poseen. No obstante, se ha descrito recientemente que la metilación también puede inducir la transcripción de ciertos genes y/o puede ser necesaria para el anclaje correcto de ciertos factores de transcripción a los promotores cuya expresión deben activar. Se sabe que el patrón de metilación del ADN puede ser alterado mediante la aplicación de compuestos químicos que hiper- o hipometilan dicha molécula. Entre esos compuestos, uno de los más usados es la 5-azacitidina (AZA) que, al ser un análogo de la citosina, puede incorporarse al ADN para pasar a formar parte de su estructura. Allí, se une covalentemente a las ADN

metiltransferasas que son degradadas debido a esta unión. De esta manera, las marcas epigenéticas son eliminadas después de varias replicaciones del ADN.

Aunque el control epigenético de la maduración del fruto ha sido mayoritariamente estudiado en tomate, se ha comprobado que la aplicación de AZA a diferentes frutos produjo un adelanto de su maduración en todos los casos. Sin embargo, su aplicación a mitades de frutos blancos de fresa produjo la respuesta contraria y la paralización del proceso de maduración del fruto en dicha zona. El análisis transcriptómico de la zona tratada y la zona control mediante secuenciación del ARN revelaron la ausencia de inducción de FTs relacionados con el control de procesos típicos de la maduración en las zonas tratadas. De igual manera, la transcripción de varios genes asociados a la síntesis de hormonas, aroma, color y textura del fruto estaba reprimida o no se produjo en la zona del fruto tratada con AZA.

Los frutos no climatéricos como la fresa no regulan su maduración por etileno. En este caso, es el balance entre auxinas y ABA el que determina esta regulación. Así, después del tratamiento con AZA, los genes relacionados con la biosíntesis de ABA fueron silenciados mientras que los implicados en su degradación aumentaron su expresión. De igual manera, genes implicados en la biosíntesis de auxinas y de giberelinas también fueron sobreexpresados en la zona del fruto tratada con AZA. Además, se comprobó que el perfil metabólico de estos mismos frutos fue más parecido al de frutos en estadio blanco de maduración, con concentraciones de antocianinas prácticamente nulas y niveles hormonales similares a los de estadios del fruto en fase de desarrollo. Así, en la zona del fruto tratada con AZA, se detectó una menor concentración de ABA bioactiva y un incremento de sus productos de degradación. De la misma manera, la concentración de auxinas y giberelinas fue mayor en la zona del fruto tratada con AZA que en la zona control, lo que indica un desajuste del contenido hormonal en este tejido. En consecuencia, el tratamiento con AZA produjo una paralización completa del proceso de maduración del fruto de fresa debido a una alteración en su contenido hormonal que se tradujo en una alteración de la expresión génica y del contenido metabólico del fruto. Este trabajo establece que las marcas epigenéticas son necesarias para el proceso de maduración del fruto de fresa y, por lo tanto, es un punto de partida para el desarrollo de nuevos trabajos que profundicen en esta regulación.



Finalmente, el gen *FaCXE2*, que codifica una enzima de tipo carboxilesterasa (CXE), fue seleccionado para su estudio en mayor profundidad. Las carboxilesterasas son enzimas hidrolíticas que pertenecen a la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasas y presentan una triada catalítica en una región conservada GX SXG de la secuencia proteica que constituye el sitio activo de la enzima. Estas enzimas participan en la degradación de xenobióticos, respuesta a estrés biótico, así como en la producción de compuestos volátiles. Durante la maduración de la fresa, se ha determinado que se produce un incremento de la emisión de compuestos volátiles aunque tan sólo dos alcohol-acil-transferasas (AATs) han sido descritas en relación con su síntesis. Ninguna CXE relacionada con este proceso ha sido caracterizada en fresa hasta ahora, lo que deja abierta su posible participación en dicha biosíntesis durante la maduración del fruto.

Los estudios transcriptómicos realizados previamente en nuestro grupo de investigación nos permitieron comprobar que *FaCXE2* estaba relacionado con el proceso de maduración y que su expresión se restringía específicamente a fruto. Además, se comprobó que su expresión estaba regulada positivamente por ABA y negativamente por auxinas. Mediante estudios de localización subcelular, se comprobó que la enzima *FaCXE2* se encuentra en el citoplasma, al igual que otras enzimas relacionadas con la producción de volátiles. En este sentido y para comprobar su función, se determinó la actividad enzimática de la proteína *FaCXE2* recombinante lo que nos permitió comprobar que esta enzima muestra mayor afinidad como sustrato por ésteres de cadena más larga.

En paralelo, se procedió al silenciamiento transitorio de la expresión de *FaCXE2* mediante agroinfiltración de frutos de fresa con *Agrobacterium* conteniendo la construcción *FaCXE2*-RNAi. Los frutos con mayor nivel de silenciamiento fueron seleccionados para determinar su concentración de volátiles. Este análisis nos permitió observar una disminución de la concentración de ésteres y un incremento de la de alcoholes en los frutos transgénicos frente a frutos control. Por tanto, el resultado de la actividad *in vitro* de *FaCXE2* junto con la acumulación de ésteres en los frutos transgénicos sugieren que esta enzima juega un papel determinante en la concentración de ésteres durante la maduración del fruto de fresa.



**SUMMARY GENERAL INTRODUCTION**



## SUMMARY GENERAL INTRODUCTION

The strawberry (*Fragaria × ananassa*) belongs to the Rosaceae family 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 fifth in the world (FAO, 2018). Moreover, between the 80-90% of the production is located in Huelva, southwest of Spain. The cultivated strawberry *Fragaria × ananassa* is an octoploid cultivar that results of the crossing between four different diploids species, *F. viridis*, *F. nipponica*, *F. iinumae* and *F. vesca*. The evolutionary studies reveal that *F. vesca* was the last genome to join and that event took place in North America (Edger et al., 2019). The genome of *F. vesca* is responsible of the majority of transcript in the octoploid cultivar. Thus, this genome is used in the transcriptome analysis as its genome has been sequenced (Edger et al., 2017, v4.0).

Physiologically, strawberry is an herbaceous perennial plant which present a central stem (crown) from roots, leaves and stolons emerge (Hancock, 1999). The interaction between temperature and photoperiod determines strawberry development, being able to reproduce sexually through fruits, or asexually through stolons. Strawberry fruit is a false fruit where the achenes, the true fruits, are embedded in the receptacle. Up to 500 achenes might be found and those are developed through the fecundation of the carpel (Erendorfer, 1983) and are composed in a combination of seed and ovary tissue. The receptacle presents a pith at the center, a fleshy cortex, the epidermis that contains the achenes and a system of vascular bundles that connects the plant with the achenes.

The developmental process in soft fruit presents an initial phase of growth and elongation, followed by a phase of ripening. In strawberry receptacle, the first growing phase relays on the development of cortex and medulla cells and will determine the final size of the fruits (Hancock, 1999). The final size will also be determined by the number and distribution of achenes in the receptacle and the percentage of fertilized carpels. Therefore, the synthesis of auxins, mainly in the form of indole-3-acetic acid, takes place in the achenes and is the main responsible of the receptacle growth, as the removal of the achenes at early stages of development inhibits the fruit growing. Gibberellins, cytokinins

and abscisic acid have a limited role in the fruit growth (Nitsch,1950; Perkins-Veazie, 1995).

In the elongation phase, the cortical cells present an isodiametric growth tied to structural changes in the cell wall and subcellular structures. On the other hand, the ripening phase takes 30-40 days to complete from anthesis and is determined by dramatic physical changes, as in the texture and color; chemical changes, as the production of aroma and flavor compounds; as well as a variation on gene expression (Knee *et al.*, 1977; Dennis, 1984). This process is dependent of natural conditions, as temperature and photoperiod, and the contribution of assimilates and the water balance between the fruit and the plant.

All the changes produced in the ripening process need the synthesis of new proteins (Manning, 1993). In this sense, some works have studied the evolution of transcript along developmental stages and ripening. Three evolution models have been described those that increases along ripening, those that decreases over ripening and other that peak at intermediate stage and then decline (Veluthambi and Poovaiah, 1984; Reddy and Poovaiah, 1990; Reddy *et al.*, 1990; Manning, 1994). Recently, the use of massive transcriptome analysis and the sequencing of the genome allowed us to identify the transcriptomic changes during development and ripening stages to select genes for further characterization in this thesis (Medina Puche *et al.*, 2016, Sanchez Sevilla *et al.*, 2017).

Fruits can be divided into climacteric or non-climacteric depending if a burst of ethylene is present to trigger the ripening process. In strawberry, the ripening occurs without an increase on ethylene production, suggesting that this process is independent of this hormone (Iwata *et al.*, 1969a, 1969b; Villareal *et al.*, 2010). However, ethylene is produced in low levels in mature fruits, suggesting that this hormone might have a secondary role in strawberry ripening (Trainotti *et al.*, 2005, Villarreal *et al.*, 2010, Merchante *et al.*, 2013). Thus, hormonal regulation of ripening is a very active field of study. Auxins inhibit fruit ripening and when their concentration decline the fruit ripening begins (Given *et al.*, 1988b). The peak concentration of gibberellins and cytokinins is present in achenes 7 days after anthesis. This suggests that GA might control the cell division in auxiliary buds and participates in the differentiation of the auxiliary buds (Hytönen *et al.*, 2009, Teneira *et al.*, 2017). On the other hand, abscisic acid (ABA) plays

many roles regulating different physiological processes in plants. It is involved in the control of seed maturation, vegetative growth, and in the response to different abiotic stresses (Mishra *et al.*, 2006). In strawberry, the increase of ABA content, around 20 days post anthesis, is concomitant with the decrease of auxins in both achenes and receptacles. The ratio ABA/auxins is controlling the ripening process and the genetic changes that take place in this transition (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). The application of exogenous ABA promotes strawberry ripening, while inhibiting its biosynthesis inhibits the process, suggesting that ABA is the hormone controlling the process (Jia *et al.*, 2011, Liao *et al.*, 2018).

Strawberry is one of the most appreciated fruits among consumers due to its organoleptic properties. The flavor is determined by the complex mixture of volatile acids and other compounds such as sugars, organic acids, phenolic acids and tannins. The receptacle is the deposit tissue of the plant. Composed by 90% and 10% soluble solids, it contains many compounds much appreciated by its nutritional benefits as vitamin C, soluble sugars and organic acids (Hollman and Venema, 1993; Maas *et al.*, 1996). Also, high concentrations of anthocyanins and flavonoids are found and compounds whose health benefits are being studied nowadays (Giampieri *et al.*, 2015). Among those compounds, carbohydrates are one of the main soluble compounds, not only providing energy for metabolic pathways also they are important in the flavor of the fruits. Moreover, organic acids are responsible for the receptacle flavor and participate in determining the color, inhibiting some enzymatic activity as those related with cell wall dissembling. Non-volatile acids are more related with the acidic content of the receptacle, while volatile acids contribute to the aroma. Up to 360 volatiles have been found in strawberry and, while being only up to 0.02% of the fresh weight, little changes in their composition may change the taste dramatically (Zabetakis and Holden, 1997).

The most noticeable change along ripening is the color change from green to red characteristic of ripen fruits. This is due to the degradation of chlorophyll and the synthesis of anthocyanins and flavonoids (Timberlake, 1981, Perkins-Veazie, 1995). Its biosynthesis takes place in white fruits using precursors from the shikimic acid pathway. Pelargonidin 3-glucose is the most abundant anthocyanin in strawberry fruit, representing up to 90% of total anthocyanin content. Anthocyanin concentration varies between different cultivars but also in response to physiological conditions.

Flowering in strawberry is induced by low temperatures and short photoperiods as the development of the floral buds depend on them. It has been described that *flowering locus T* might be the responsible gene that suppress the stolon development and is associated with independent environmental conditions flowering (Perrote *et al.*, 2016a).

As sessile organism, plants are exposed to different biotic and abiotic agents in their habitat. Moreover, in the lately years the global climate change is changing the environmental conditions dramatically. Those stresses might decrease strawberry production up to 50% (Vij y Tyagi, 2007). Thus, the studies focusing on physiological, biochemical and molecular responses to those stresses are growing in an effort to reduce the lost produced by them. The TF *RdreB1B1* has been identified to improve the response to different stresses, as cold, drought and salinity (Gu *et al.*, 2013, 2015, 2017). Moreover, transcriptome studies comparing plants subjected to different stresses have identified to several genes putatively involved to modulate the plant response. More studies are needed to characterize the role played by them. On the other hand, many diseases and plagues also affect strawberry crops, causing a high economic impact on farmers, due to pesticide treatment and fruit losses. 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 fragariae* (Haymes *et al.*, 1997). Moreover, both *FaRCa1* and *FaRCg1* are two loci located in the chromosome 6 related with the resistance to *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*, respectively (Anciro *et al.*, 2018, Salinas *et al.*, 2018). Thus, transgenic strawberry plants with high levels of chitinase reduce the harm effects caused by the mildew fungus (Asao *et al.*, 1997, 2003).

Improving of the fruit quality have received the most attention in breeding and biotechnology programs. Taste, thus the combination of sweetness, acidity and aroma are the most important quality traits to decide whether to purchase or not. Therefore, the genes involved in those processes are being studied using transgenic plants although this technology is quite slow due to the time needed to regenerate these plants. Moreover, the european legislation is still very restrictive, blocking the using of transgenics crops. The



development of the CRISPR/Cas9 technology, able to edit the DNA without introducing exogenous material in the genome, and its application in the octoploid strawberry will allow to a faster genetic improvement in strawberry (Jinek *et al.*, 2012, Martín-Pizarro *et al.*, 2018).



# **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

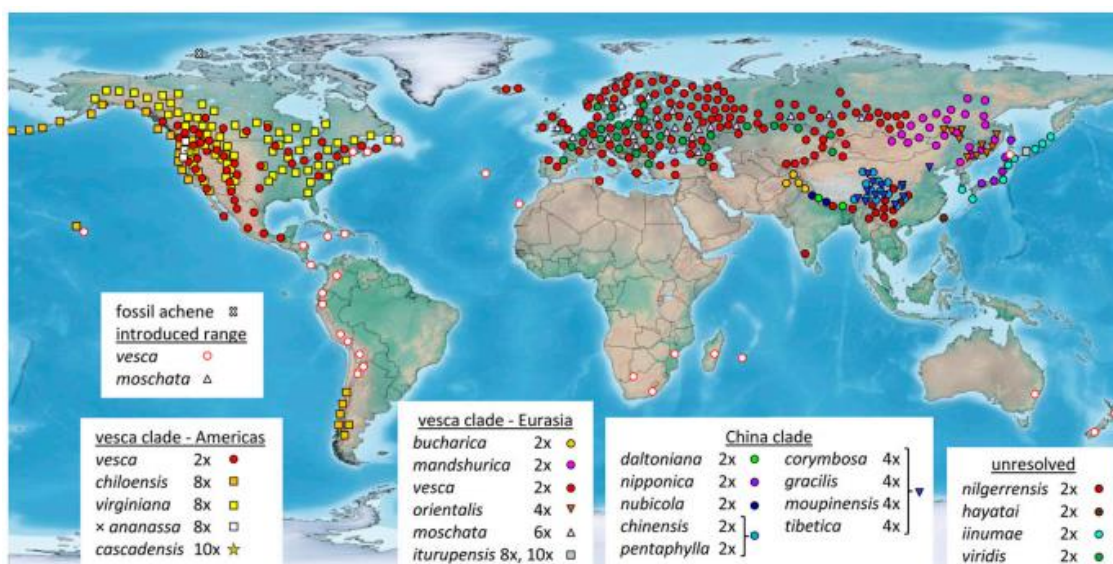
## 1. La planta de fresa: generalidades

### 1.1. Origen, especiación y evolución

La fresa es un fruto de tipo baya de gran importancia económica en todo el mundo. Está incluido en el género *Fragaria* L perteneciente a la familia de las rosáceas (*Rosaceae*), donde también se incluyen otras especies frutales de gran importancia económica como *Prunus* (melocotoneros y albaricoques), *Pyrus* (peras), *Malus* (manzanas) y especies de uso ornamental como el género *Rosa*. Además, dentro del género *Fragaria*, se incluyen 23 especies (Tabla 1) distribuidas geográficamente en el hemisferio norte (Staudt, 1989, 1999a, b; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009), Sudamérica, sur de África y Australia (Linston *et al.*, 2014). Cada especie se encuentra restringida a un continente, salvo *F. vesca* que se encuentra tanto en Eurasia como América (Staudt, 1962, Staudt, 1989). Se ha realizado un amplio estudio de las especies europeas y americanas (Staudt *et al.*, 1989; 1999a), así como de las asiáticas (Staudt 1999b, 2003, 2005; Staudt y Dickoré., 2001), quedando bajo estudio las especies chinas, lo que significaría el análisis taxonómico mundial (Figura 1).

**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. bucharica</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. chilensis</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

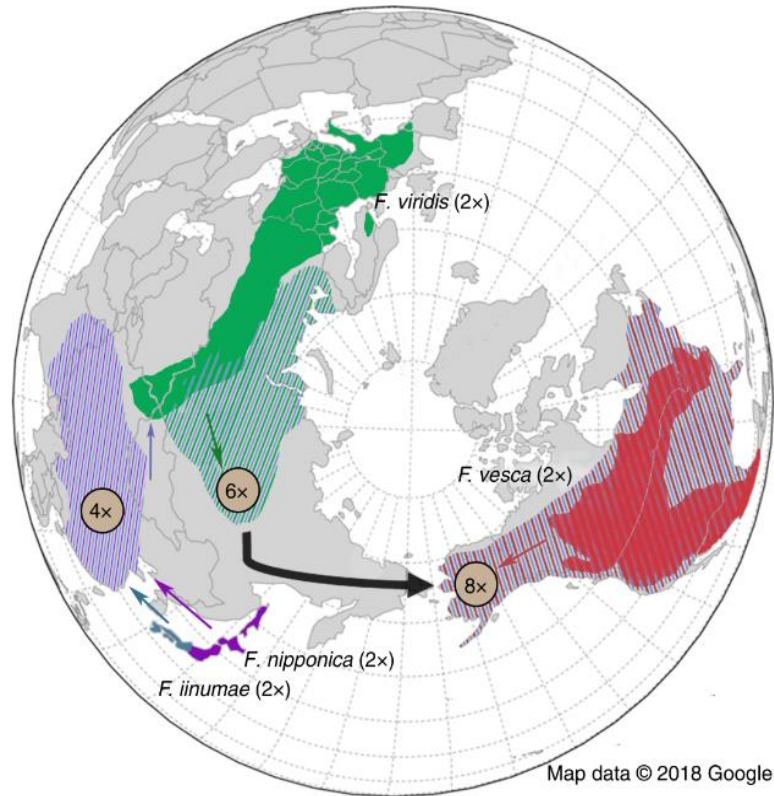


**Figura 1.** Distribución mundial de los componentes del género *Fragaria*.  
Extraído de Liston et al., 2014.

Históricamente, la domesticación de los cultivos comerciales de fresa (*Fragaria* × *ananassa*) se creía bien documentada. Plantas de la especie nativa americana *F. chiloensis* fueron llevadas a Francia desde Chile por el oficial francés Amédée Frézier en 1716. Éste regaló una de las plantas al director del Real Jardín Botánico de París, Antoine de Jussieu, donde se cruzaron con clones de *F. virginiana* Duch dando lugar a la actual *F. ananassa* (Hancock, 1999). A su vez, el genoma tetraploide de cada una de estas especies se creía formado por la fusión e interacción de los genomas diploides de otras dos especies, evento que se dató hace un millón de años aproximadamente (Njuguna et al., 2013). Así, en un intento por identificar los progenitores de *F. ananassa*, se incluyó a *F. vesca* y a *F. iinumae* como posibles parentales diploides (Hancock, 1999). No obstante, no se descartan otros eventos evolutivos partiendo de otras especies diploides como *F. viridis* (Sargent et al., 2003; Nier et al., 2006) y *F. nubicola* (Sargent et al., 2004; 2006 y 2007; Vilanova et al., 2008) en las investigaciones genómicas de *F. ananassa*. De hecho, el análisis poligénico de secuencias espaciadoras internas de los DNA cloroplásticos y ribosómicos de *ananassa*, realizado por Potter et al. (2000), propuso a *F. vesca*, *F. nubicola* y *F. orientalis* como posibles progenitores de las especies octoploides.

Recientemente, y gracias a la secuenciación por vez primera del genoma completo de la especie octoploide *F. ananassa* (Edger et al., 2019), se ha conseguido una potente herramienta para el estudio del origen filogenético de esta especie. En este trabajo, se han separado por primera vez cada uno de los cromosomas de fresa y se han secuenciado y ensamblado de manera independiente. De esta manera, se ha podido identificar a *F. vesca*, *F. iinumae*, *F. nipponica* y *F. viridis* como parentales de *F. ananassa*. Este estudio, junto a su distribución geográfica y la historia natural y huella genética de los parentales diploides, ha permitido establecer una teoría

de la formación cronológica de la especie cultivada. Así, especies tetraploides y hexaploides, como *F. Moschata*, pueden ser intermedios evolutivos en la formación de la variedad octoploide. Además, este estudio sugiere que *F. vesca* fue el último parental incorporado al genoma y que la especie octoploide se originó en el norte de América, teoría apoyada por el estudio del ADN plastidial de dicha especie (Njunga *et al.*, 2008; Edger *et al.*, 2019) (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo de evolución genética y espacial del género *Fragaria* hasta el origen de *F. ananassa*. Extraído de Edger *et al.*, 2019.

Las especies aloploiploides presentan la dificultad de albergar diferentes genomas parentales, cada uno con sus marcas epigenéticas y diferentes evoluciones dentro del mismo núcleo. Debido a ello, se ha propuesto la teoría de un subgenoma dominante, lo cual resolvería alguno de estos problemas (Schnable *et al.*, 2011). Dentro del genoma octoploide, el subgenoma perteneciente a *F. vesca* parece ser el dominante en comparación a los otros tres. Este subgenoma aporta un 20% más de genes codificantes que el resto, lo que indica que ha estado expuesto a una mayor presión selectiva que los demás (Edger *et al.*, 2019). Así, los genes correspondientes a *F. vesca* son responsables de un 88.8% de los genes implicados en la síntesis de antocianinas, un 89.2% de las síntesis de terpenos y un 95.3% de las síntesis de fructosa (Edger *et al.*, 2019).

El uso de herramientas genéticas, empleando como base el genoma de *F. Vesca*, está ampliamente extendido en la comunidad científica. El genoma de *F. vesca* ha sido secuenciado

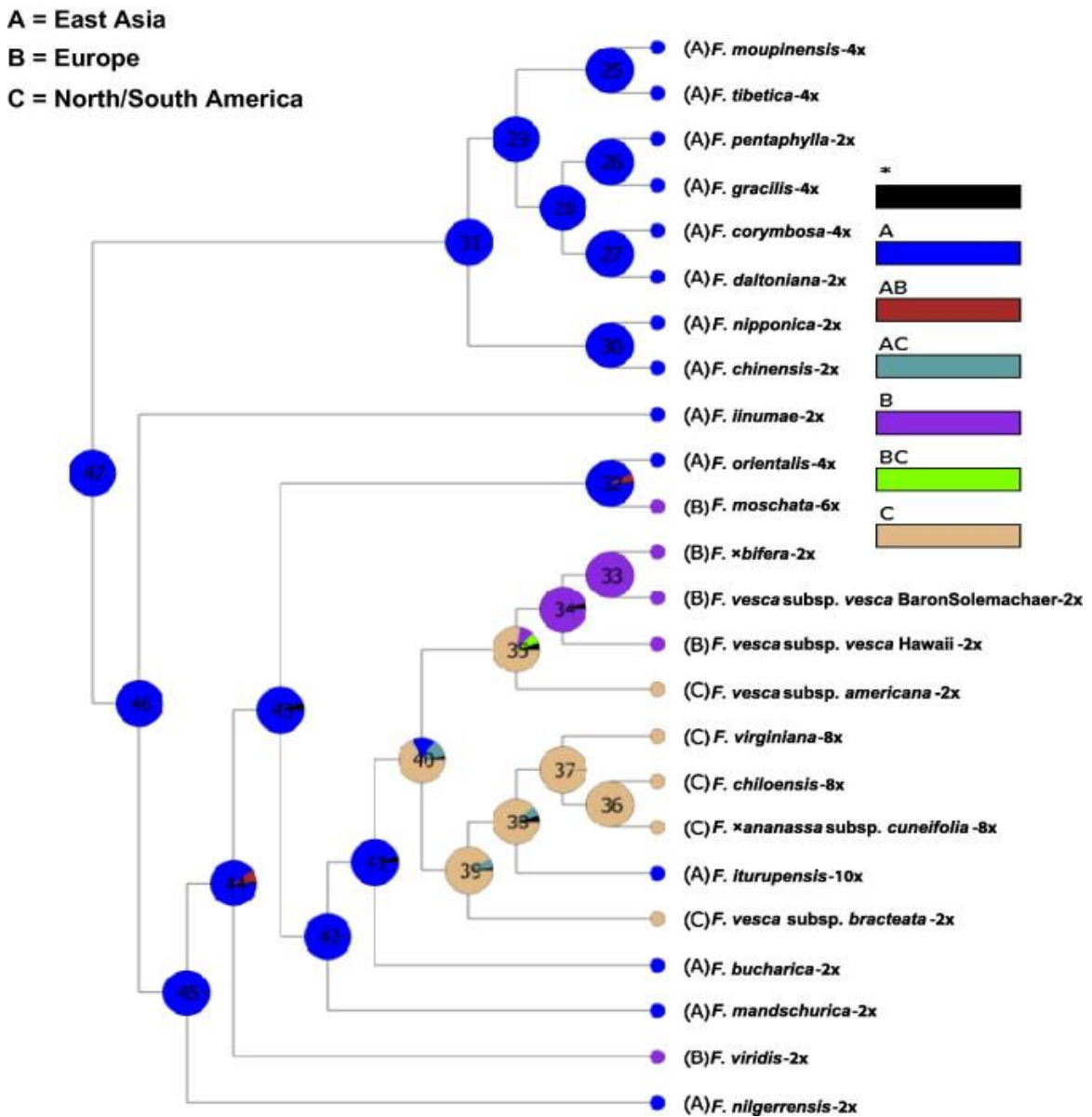
en diversas ocasiones: Shulaev *et al.*, 2011 v1.0; Tennesen *et al.*, 2014 v2.0 y Edger *et al.*, 2017, v4.0; esta última separando físicamente los cromosomas antes de su secuenciación. De igual manera, existe una amplia batería de datos transcriptómicos procedentes de experimentos de ARN-seq y microarray que permiten, adicionalmente, el estudio comparativo del ADN recombinante y genómico entre diferentes especies de rosáceas. El depósito de todas las secuenciaciones y transcriptomas generados ha permitido la creación de una base de datos específica de rosáceas ([www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) que incluye toda la información genómica de fresa disponible actualmente.

## 2. Citología y análisis filogenético

Las especies del género *Fragaria* presentan un número cromosómico básico de siete ( $x = 7$ ) (Ichijima, 1926). Aun así, se han identificado diversos grupos de fertilidad: diploides, como *F. vesca* ( $2n = 2x = 14$ ) o *F. iinumae* (Oosumi *et al.*, 2006); tetraploides ( $2n = 4x = 28$ ), como *F. Orientalis*; hexaploides, como *F. moschata* ( $2n = 6x = 42$ ); octoploides ( $2n = 8x = 56$ ), que incluyen a *F. chiloensis*, *F. virginiana* y el híbrido cultivado *F. ananassa* y, por último, el decaploide *F. iturupensis* (Tabla 1) (Hirakawa *et al.*, 2014). Se han propuesto tres modelos de distribución cromosómica para *F. ananassa*, según datos genéticos y citológicos: AABBBBCC (Federova *et al.*, 1946), AAA'A'BBBB (Senanayake *et al.*, 1967) y AAA'A'BBB'B' (Bringhurst, 1990). 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 aloploiploide del genoma de *F. ananassa* (Hirakawa *et al.*, 2014). En muchos de estos sistemas se presenta la dificultad de asignar a cada parental qué copia genética le pertenece, esto es, que homeólogo pertenece a cada parental. En este caso, dentro de la especie cultivada *F. ananassa*, cada progenitor presenta un par completo de cromosomas homeólogos, lo cual facilita la asignación de cada gen a su parental.

En general, los cromosomas del género *Fragaria* son pequeños, pudiendo variar entre 0,9 a 1,7 micras de longitud, y presentan poca variación morfológica entre especies (Iwatsubo y Naruhashi, 1989; 1991; Yarnell, 1928). En las especies diploides, no se ha observado ningún comportamiento cromosómico irregular durante divisiones heterotópicas, donde siempre se conservan los 14 cromosomas somáticos identificados en metafase. Para especies octoploides, es difícil identificar el número de cromosomas, debido al empaquetamiento irregular de los mismos, pero se estimó que pueden ser 56, un número esperable para una especie octoploide con un número haploide de cromosomas  $x = 7$ .

Las relaciones filogenéticas de la especie *Fragaria* han sido estudiadas en diferentes trabajos usando, principalmente, ADN plastidial y secuencias espaciadoras de transcripción interna (ITS) de la región nuclear (Harrison *et al.*, 1997; Potter *et al.*, 2000, Sagent, 2005). Estos primeros estudios solo incluyen especies diploides que son divididas en tres clases. Una de ellas contiene únicamente a la especie japonesa *F. iinumae*, otro grupo que contiene a la mayoría de las especies asiáticas y la última que contiene a *F. vesca*, *F. bucharica* y *F. viridis*. Estudios posteriores de secuenciación refuerzan los tres grupos presentados anteriormente (Figura 3) englobando a las especies octoploides como *F. ananassa*, *F. chiloensis* y *F. virginiana* en el grupo de *F. vesca* (Njuguna *et al.*, 2013; Russeau-Guertin *et al.*, 2009).

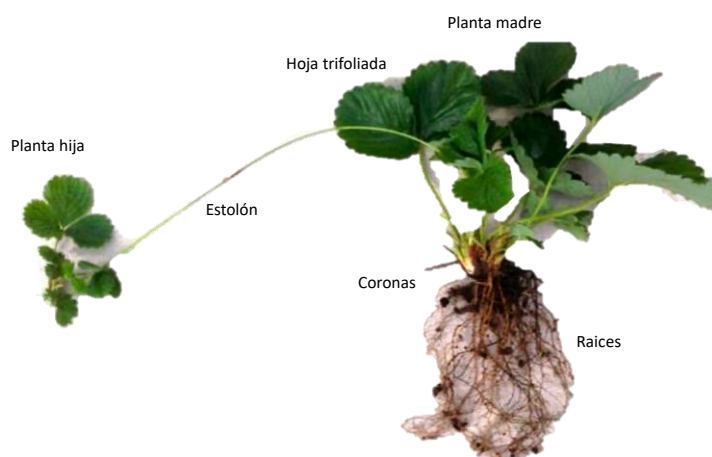


**Figura 3.** Árbol biogeográfico de diferentes especies del género *Fragaria*. Las especies han sido asignadas a tres regiones geográficas A: Este de Asia, B: Europa, C: América.



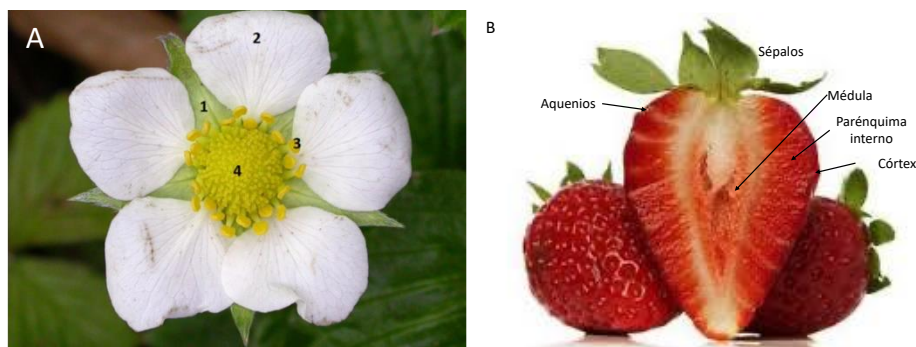
### 3. Morfología de la planta de fresa

La planta de fresa es perenne, de porte pequeño y compuesta por diferentes meristemas. Su desarrollo está controlado tanto por la temperatura como por el fotoperiodo. Su reproducción puede producirse de manera sexual, mediante frutos, o asexual, mediante estolones. Aunque es considerada una planta herbácea, en realidad se trata de una especie leñosa perenne con pautas fisiológicas similares a árboles y arbustos de hoja caduca y un ciclo de vida corto, de doce a veinte semanas por generación (López-Aranda, 2008). La planta presenta un tallo central, comprimido en una roseta basal o corona. De ella emergen raíces de tipo fasciculado y hojas trifoliadas dentadas, de haz glabrescente y envés con pelos aplicados, cuyos peciolo pueden alcanzar 20 centímetros de longitud. En el extremo axilar de cada hoja, se encuentra una yema o meristemo axilar a partir del cual pueden desarrollarse estolones o inflorescencias, dependiendo de las condiciones medioambientales. De la misma manera, a partir de los estolones o tallos rastreros, se producen raíces adventicias que pueden generar nuevas plantas o plantas hijas a través de reproducción asexual (Figura 4).



**Figura 4.** Morfología de la planta de fresa.

Los meristemas axilares pueden generar inflorescencias de pétalos blancos, hermafroditas y receptáculo amarillo. La flor presenta un gineceo coricárpico donde cada carpelo representa un carpido y en el que el androceo se ha multiplicado de modo secundario por intercalación (Figura 5A). De cada carpelo fecundado se forma un fruto indehiscente (aquenio) que se dispone sobre la superficie del eje floral (receptáculo) que adopta un aspecto cónico y textura carnosa para dar lugar a un fruto múltiple (Erendorfer, 1983) (Figura 5B). La fresa es, por tanto, un fruto blando que, como otras bayas con estructura de falso fruto carnoso, presenta los verdaderos frutos, los aquenios, en el exterior (Figura 5B).

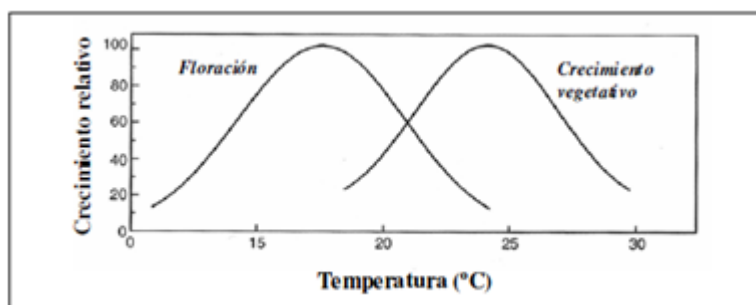


**Figura 5.** A) Flor completamente desarrollada de la planta de fresa. (1. sépalos, 2. pétalos, 3. estambres, 4. receptáculo, en el que se incluyen los pistilos). B) Estructura del fruto de fresa.

Las condiciones ambientales son las que determinan que la reproducción de la planta se produzca de forma sexual o asexual. En los cultivares de día corto, las flores aparecen cuando los días son cortos y las temperaturas bajas, mientras que producen estolones en días largos y temperaturas más altas. Por otro lado, en los cultivares día neutro, la duración de los días no influye y se producen flores con un patrón cíclico pero a temperaturas relativamente frías (Tabla 2, Figura 6). Las variedades remontantes, o de día largo, producen flores en días más largos y estolones desde el principio de la primavera hasta el otoño, con el comienzo de las altas temperaturas. A diferencia de las variedades de día corto, las de día largo producen menos estolones y tienden a multiplicar el número de coronas por planta. Los términos neutro y remontante suelen usarse indistintamente, sin embargo, las variedades remontantes han sido seleccionadas en zonas continentales y nórdicas, mientras que las de día neutro han sido seleccionadas mediante mejora genética tradicional, buscando eliminar la dependencia del fotoperiodo para aumentar la producción durante todo el año.

**Tabla 2.** Número medio de inflorescencias y estolones en variedades de día corto y neutro sometidas a diversas temperaturas durante tres meses (Adaptado de Hancock, 1999).

Temperatura (°C)	Día corto		Día neutro	
	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



**Figura 6.** Perfil de floración y crecimiento vegetativo de plantas de fresas a diferentes temperaturas. (Adaptado de Hancock, 1999)

### 3.1. Morfología del fruto: aquenios y receptáculo

En la base de cada pistilo, y cuando éste es fecundado, se generan los aquenios. Estos son una combinación de tejido de la semilla y tejido ovárico y se encuentran embebidos en la capa epidérmica del receptáculo. A través de haces fibrovasculares, se conectan con el resto del receptáculo y reciben los nutrientes necesarios para el desarrollo del ovario (Darrow, 1966). El número de aquenios presente en cada fruto dependerá del cultivar y de las condiciones de crecimiento de éste, variando entre 20 y 500. Los aquenios presentan un pericarpio grueso, una delgada testa, una única capa endospermica y un embrión que completa su desarrollo alrededor de diez días después de la antesis (Thompson, 1963).

Por otro lado, en el receptáculo, el tejido vascular forma un eje central alrededor del cual se disponen los tejidos parenquimatoso y epidérmico del córtex (Havis, 1943). Los haces vasculares se extienden desde el pedicelo, que lo conecta al resto de la planta, atravesando el tejido parenquimático hasta alcanzar a los aquenios. La epidermis es ligeramente pubescente, formada por una o dos capas delgadas de células. También, se presentan estomas protuberantes y abiertos relacionados con la transpiración y respiración del fruto (Perkins-Veazie, 1995).

## 4. Composición del fruto de fresa

El fruto es el tejido sumidero más importante en la planta de fresa, llegando a acumular entre el 20-40% de su peso seco. El desarrollo de frutos inhibe la producción de estolones y coronas pero no afecta al total del peso seco, salvo en la raíz, donde se produce una reducción de biomasa (Hancock, 1999). Este fruto es uno de los más apreciados por los consumidores, principalmente, debido al delicado sabor y aroma que presenta y, además, es un alimento muy saludable debido a su valor nutricional (Giampieri *et al.*, 2014). El fruto maduro está compuesto por un 90% de agua mientras que, el 10% restante, son sólidos solubles que incluyen numerosos compuestos importantes en la dieta (Hemphill y Martin, 1992), como un alto contenido en fibra y fructosa (Tabla 3). Además, los aquenios presentan un alto nivel de ácidos grasos insaturados de los que el 72% son poliinsaturados (USDA, 2010).

La fresa es rica en vitamina C (ácido ascórbico), siendo una de las frutas con mayor contenido de esta vitamina. De hecho, 10 fresas proporcionan el 95% de los requerimientos dietéticos diarios recomendados de vitamina C (Maas *et al.* 1996). El alto contenido de esta vitamina es especialmente importante ya que, en humanos, primates y otros mamíferos, la vitamina C no se puede sintetizar debido a la falta de la última enzima de su ruta de biosíntesis, la L-gulonolactona oxidasa (Chatterjee, 1973). La vitamina C se sintetiza a partir del precursor D-glucosa-6-fosfato (D-Glu-6-P) a través de diferentes vías: en animales, la D-Glu-6-P

se sintetiza a partir de ácido D-glucurónico formando el precursor gulono-1,4-lactona. En plantas, la ruta es más compleja e involucra diferentes glucósidos (fructosa, manosa) hasta llegar a galactono-1,4-lactona (Wheeler *et al.*, 1998). Se ha propuesto una vía alternativa para la síntesis de vitamina C en plantas, sugiriendo que la degradación de componentes pectínicos de la pared celular, como el ácido galacturónico (GalUA) pueden ser precursores de la síntesis de vitamina C (Agius *et al.*, 2003). El gen *GalUA reductasa* de fresa (*FaGalUR*) presenta un patrón de expresión transcripcional correlacionado con el proceso de maduración, lo que parece indicar una relación entre este proceso y el aumento del contenido de vitamina C (Agius *et al.*, 2003). Además, la expresión ectópica en tomate de *FaGalUR* aumenta moderadamente el contenido de ácido ascórbico, así como la capacidad antioxidante total de los frutos (Amaya *et al.*, 2014). Por otro lado, la sobreexpresión de una GDP-L-galactosa fosforilasa de kiwi en plantas de fresa produjo un aumento de la concentración de vitamina C de hasta dos veces sin generar ningún cambio fenotípico en el fruto (Bulley *et al.*, 2012). La ruta de síntesis y reciclaje de vitamina C se ha encontrado también en aquenios, los cuales presentan concentraciones de ácido ascórbico de hasta un tercio de las presentes en el receptáculo (Aragüez *et al.*, 2013).

El ácido cítrico es el ácido orgánico principal del fruto de fresa y representa aproximadamente el 90% del contenido total de ácidos del mismo (Green, 1971). Le siguen en concentración el ácido málico y el ácido ascórbico (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 y, en todo caso, aumentan durante este proceso (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

Los azúcares son otro de los componentes principales del fruto. Glucosa y fructosa son los principales azúcares solubles de la fresa, constituyendo más del 80% de los azúcares totales y hasta el 40% del peso seco del fruto (Wrolstad y Shallenberger, 1981). Se encuentran presentes en todos los estadios de desarrollo y maduración, incrementando ligeramente su concentración desde el 5% presente en estadio verde hasta el 6.9% de frutos maduros (Kader, 1991, Maas *et al.*, 1996, Ornelas-Paz *et al.*, 2013). En general, el dulzor del fruto está regulado por la acción de las invertasas, que controlan el nivel de azúcares en el fruto (Ranwala *et al.*, 1992; Manning, 1998).

Por otra parte, la concentración de sacarosa es generalmente mucho más baja que la de glucosa y fructosa y muestra un pequeño incremento cerca del desarrollo del fruto (Forney y Breen, 1985). Esto parece indicar que, pese a su menor concentración, juega un papel clave en la regulación de la maduración del fruto (Jia *et al.*, 2013). Así, la reducción del contenido de sacarosa en receptáculos mediante el silenciamiento transitorio de su receptor, *FaSUT1*, produjo una

disminución de los niveles de ácido abscísico (ABA) que condujo, a su vez, a un retraso de la maduración. En cambio, la sobreexpresión de *FaSUT1* incrementó el contenido de sacarosa y el de ABA acelerando así el proceso de maduración (Jia *et al.*, 2013). De igual manera, se ha demostrado que la sobreexpresión del factor de transcripción *FaMYB44.2* reprime la expresión de *FaSPS3*, un gen clave en la síntesis de sacarosa. Esta sobreexpresión resultó en una menor acumulación de azúcares, como fructosa, galactosa y sacarosa (Wei *et al.*, 2018a). Además, la aplicación exógena de sacarosa produjo cambios transcriptómicos y fenotípicos similares a los producidos por la aplicación de ABA, reduciendo el tiempo de maduración e induciendo la sobreexpresión de genes clave en el proceso de maduración como *FaNCED1*, *FaSnRK2.2* y *FaCELL1*, relacionados con el metabolismo y señalización de ABA y con el reblandecimiento del fruto, ambos procesos asociados a la maduración (Luo *et al.*, 2020).

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

<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		

Las fresas son fuente de compuestos fitoquímicos (ácido elágico, antocianinas, quercetina y catequina), vitaminas (ácido ascórbico y ácido fólico), polifenoles y antioxidantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración de estas moléculas bioactivas puede verse afectada significativamente por el cultivar, las prácticas agrícolas, el almacenamiento postcosecha de los frutos y los métodos de procesamiento utilizados (congelación o calor seco).

La ingestión de fresas tiene efecto positivo en la prevención de la inflamación, de enfermedades cardiovasculares, de obesidad e incluso de ciertos tipos de cáncer (Giampieri *et al.*, 2015). De hecho, se ha observado que el consumo controlado de fresas disminuye el contenido total de colesterol, LDL y triglicéridos en sangre mientras que aumenta el de vitamina C, atenuando así el estrés oxidativo producido por una dieta rica en grasas, y la hiperlipidemia de sujetos con factores de riesgo cardiovascular (Álvarez-Suárez *et al.*, 2014). 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 apropiada de la ingesta necesarias para modular los niveles de los citados biomarcadores o las vías relacionadas con enfermedades crónicas (Basu *et al.*, 2014).

## **5. Fisiología del fruto de fresa**

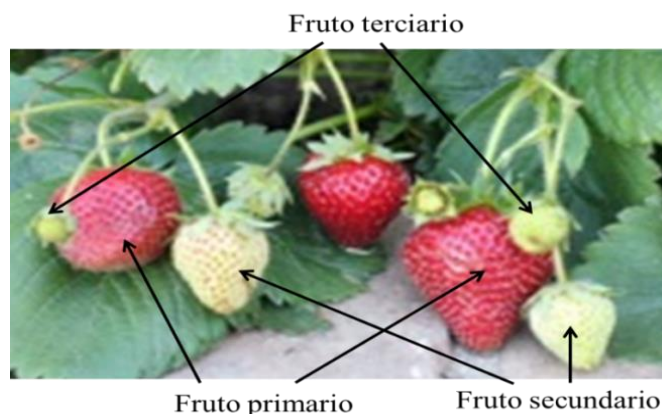
Los frutos blandos comparten ciertas características comunes a lo largo de su desarrollo. En general, presentan una fase inicial de crecimiento y elongación del fruto seguida de una fase de maduración caracterizada por determinados cambios físicos (cambios de textura y color) y químicos (producción de aromas y sabores), debidos fundamentalmente a la variación de los patrones de expresión génica característicos de cada tipo de fruto (Gapper *et al.*, 2013).

### **5.1. Cambios macroscópicos**

#### **5.1.1. Crecimiento**

El desarrollo del fruto está determinado por el porcentaje de carpelos fertilizados, así como el número y distribución de los aquenios sobre el receptáculo. Los aquenios son los responsables primarios de la síntesis de auxinas y esta síntesis viene condicionada por su correcta fecundación (Nitsch, 1950; Dreher y Poovaiah, 1982; Archbold y Dennis, 1984). Las auxinas se translocan por el floema basipétalmente desde los aquenios hasta el pedúnculo y son las responsables del crecimiento del receptáculo (Nitsch, 1950). La separación parcial de aquenios en frutos verdes da lugar a un receptáculo maduro expandido sólo en las proximidades de los aquenios presentes, mientras que la separación total de los aquenios aborta el desarrollo del fruto. La aplicación exógena de auxinas sintéticas restaura el crecimiento del receptáculo a pesar de haberse retirado los aquenios (Nitsch, 1950). El crecimiento del fruto ha sido atribuido a la capacidad de las auxinas para estimular el transporte de nutrientes al mismo. Por ello, las variaciones en el tamaño del fruto entre los distintos cultivares podrían estar determinadas por la actividad promotora del crecimiento que ejerce cada uno de los aquenios. Otras hormonas, como giberelinas, citoquininas y ABA, parecen tener un papel limitado en la regulación del crecimiento del fruto (Perkins-Veazie, 1995).

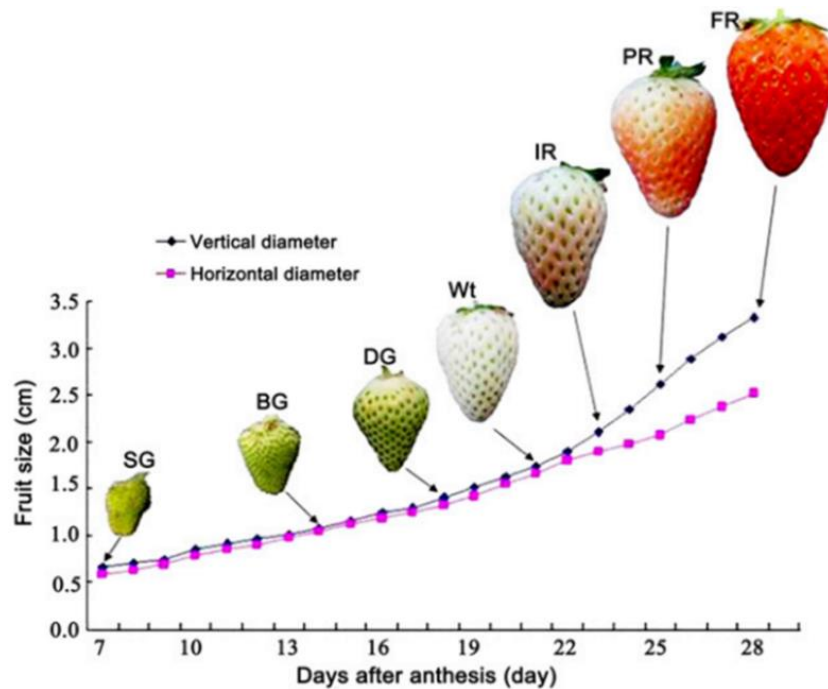
El crecimiento del receptáculo depende muy directamente del desarrollo de las células del córtex y de la médula, siendo ésta última la principal responsable del tamaño final del fruto (Hancock, 1999). La posición del fruto en la inflorescencia también determina su tamaño, así su tamaño es menor según se trate de frutos primarios, secundarios o terciarios (Moore *et al.*, 1970) (Figura 8). Este hecho podría estar relacionado con un periodo de retraso tras la polinización, que puede ser 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 que indica que existe una competencia entre frutos (Stutte y Darnell, 1987).



**Figura 8.** Identificación de los frutos primarios, secundarios y terciarios en una planta de fresa.

Dependiendo de las condiciones medioambientales, el fruto alcanza su tamaño total y definitivo aproximadamente 30 días después de la antesis. La cinética del crecimiento varía según el cultivar. Así, algunos presentan 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). El crecimiento bimodal del receptáculo está relacionado con el desarrollo del endospermo y del embrión dentro de los aquenios (Perkins-Veazie y Huber, 1987), mientras que el segundo periodo de crecimiento coincide con la maduración del embrión en los aquenios, fenómeno que acompaña a la maduración del receptáculo.

El peso fresco del fruto crece exponencialmente hasta el décimo día después de la polinización debido al aumento de la división celular. Posteriormente, el crecimiento del fruto en tamaño se debe a la expansión celular y, a partir del día 20, comienza una segunda fase de incremento rápido de peso debido a la acumulación de asimilados fotosintéticos. El cambio de color se observa a partir del día 25 y, tras 35 días, se completa el proceso de maduración (Knee *et al.*, 1977) (Figura 9). El tiempo necesario hasta la completa maduración del fruto es variable ya que depende de las condiciones medioambientales y de la variedad.



**Figura 9.** Crecimiento del receptáculo del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración. (Extraído de Jia *et al.*, 2011).

### 5.1.2. Elongación

Durante la fase de elongación, las células corticales experimentan un crecimiento isodiamétrico acompañado de importantes cambios en la pared celular y en la estructura subcelular (Cheng y Breen, 1992). Esta etapa está condicionada por los efectos directos de la temperatura, del aporte de asimilados fotosintéticos necesarios para el crecimiento o almacenamiento y del balance hídrico entre el fruto y la planta. El aporte hídrico a la planta se correlaciona directamente con el crecimiento ya que el estrés hídrico, bien por déficit hídrico y/o incremento de temperatura, disminuye la tasa de crecimiento y, por lo tanto, el tamaño final del fruto (Pearce *et al.*, 1993). No obstante, a corto plazo, los efectos de estos factores abióticos pueden llegar a ser beneficiosos ya que la temperatura acelera la velocidad de división y elongación celular y, por tanto, del proceso de maduración del fruto; y la irradiación estimula la tasa de fotosíntesis y, por tanto, el aporte de carbono al fruto (Cockshull *et al.*, 1992).

### 5.1.3. Maduración

Fisiológicamente, la maduración es un proceso rápido de corta duración en el que los frutos desarrollan propiedades organolépticas que los hacen óptimos para su consumo. En fresa, la maduración concluye 30 - 40 días después de la antesis y transcurre con cambios de color, sabor y textura en el receptáculo. El proceso debe desarrollarse con el fruto unido a la planta ya que, si se separa, sus propiedades organolépticas disminuyen drásticamente (Dennis, 1984). Durante la maduración, se produce un aumento del tamaño de la célula derivado, principalmente, de la

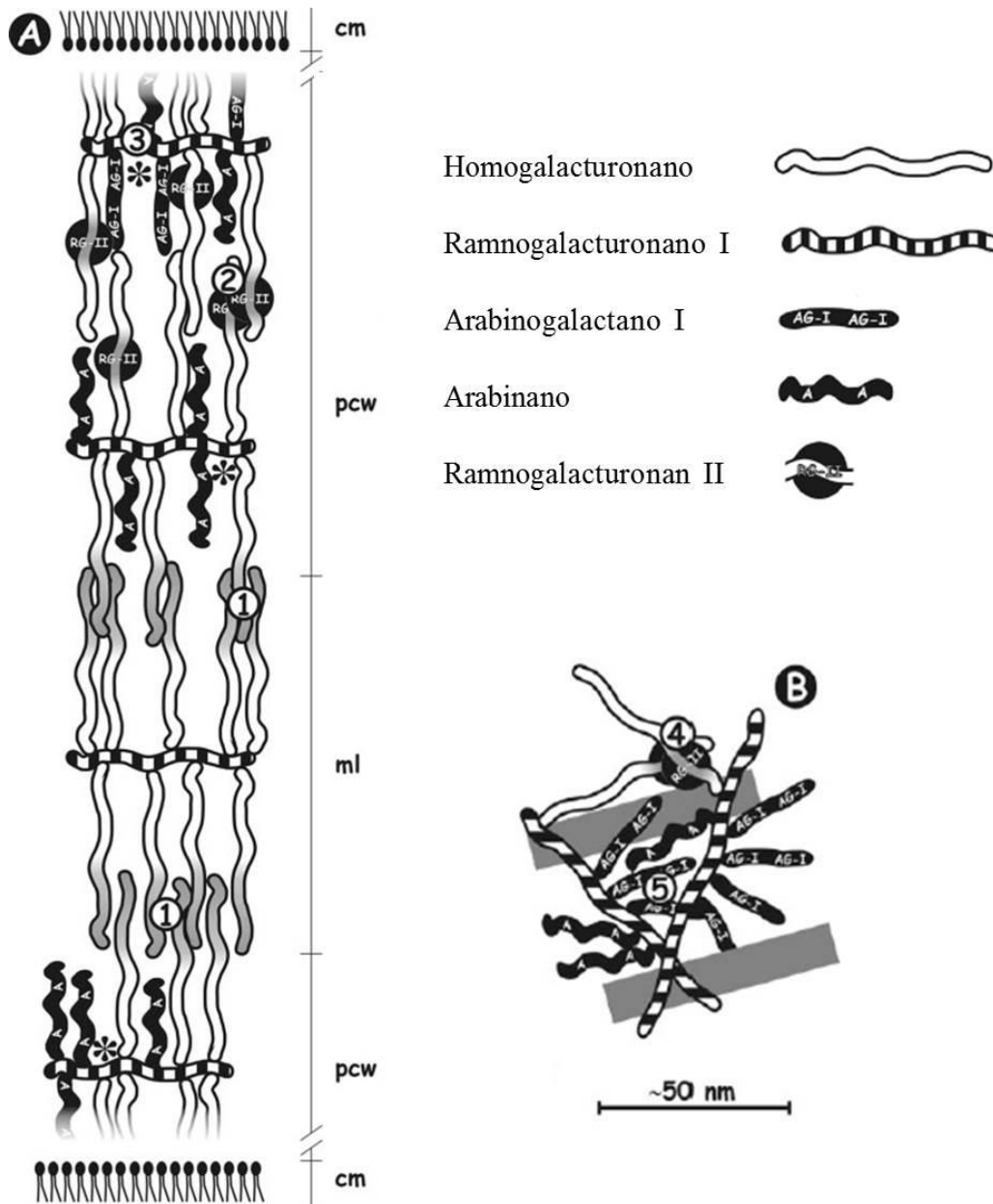


formación de grandes vacuolas necesarias para el almacenamiento de los compuestos sintetizados en el proceso. Además, se produce una modificación de la pared celular que provoca la oclusión del espacio intercelular (Neal, 1965).

Una de las propiedades más importantes a la hora de determinar el grado de madurez y la calidad del fruto es la firmeza. Ésta viene determinada por la turgencia celular y por las características y composición de la pared celular. Desde el punto de vista del consumidor, la textura es la principal cualidad requerida para la elección del fruto (Guolao y Oliveira, 2008). El reblandecimiento no solo determina la vida post-cosecha de la fruta, sino que tiene un gran impacto económico ya que influye en la frecuencia de la recogida, el procesado industrial de la fruta y la distancia de transporte para su venta. El reblandecimiento del fruto comienza con la modificación de la pared celular primaria, debido a la solubilización y despolimerización de los polisacáridos que forman parte de ella, así como con la pérdida de la unión célula-célula, debida a la disolución de la lámina media. La composición y estructura de los polisacáridos de la pared celular del fruto han sido estudiadas en tres cultivares con diferente firmeza (“Camarosa”, la más firme; “Toyonaka”, de firmeza media; y “Pájaro”, la más blanda) durante su desarrollo y maduración (Rosli *et al.*, 2004). El estudio determinó que las diferencias principales entre ellas radicaban en el contenido de polisacáridos de la pared. Así, aunque la cantidad de hemicelulosa y celulosa de la pared disminuyó durante la maduración del fruto en los tres cultivares evaluados, no hubo diferencias reseñables en su contenido en etapas maduras, lo que sugiere que este polisacárido no ejerce un papel fundamental en el reblandecimiento del fruto de fresa en etapas tardías de la maduración (Rosli *et al.*, 2004; Palomer *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 2014). Sin embargo, sí parece que la degradación de pectinas es el principal responsable del reblandecimiento del fruto. Las pectinas componen hasta el 60% del total de masa de la pared celular y son el componente principal de la lámina media (Rosli *et al.*, 2004; Santiago-Doménech *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2009).

En las paredes celulares de las plantas se pueden distinguir tres tipos de pectinas: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RG-I), y ramnogalacturonanos II (RG-II) (Figura 10). En la lámina media de la pared celular, los HGA son los componentes predominantes (Vincken *et al.*, 2003). Los HGA contienen grupos heteropoliméricos de cuatro cadenas laterales de longitud constante. Estas cadenas laterales y los residuos a los que están conectados se conocen como RG-II (Vincken *et al.*, 2003). Por otro lado, 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.



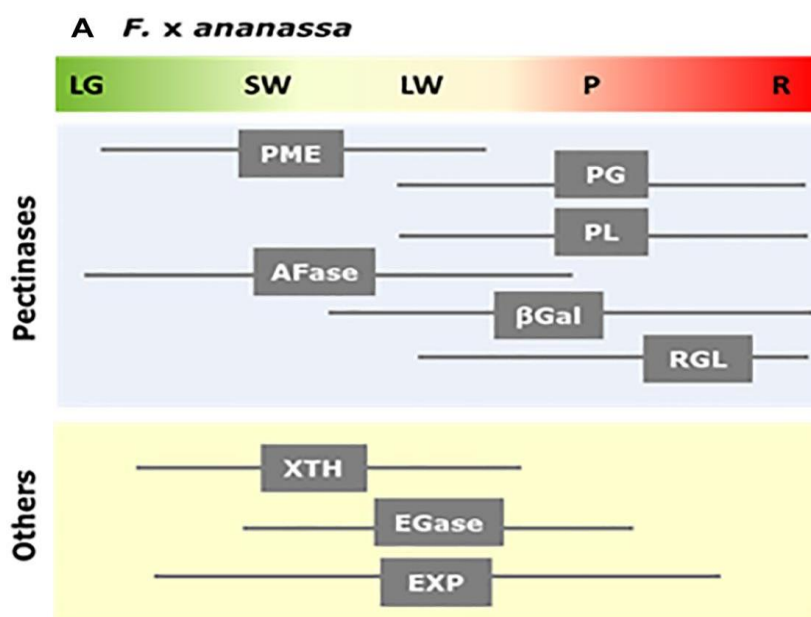
**Figura 10.** Modelo propuesto para la estructura de la red de pectinas presente en la lámina media y pared celular primaria del fruto de fresa (Vincken et al., 2003). A.- Vista lateral de dos paredes celulares primarias separadas por una lámina media que conecta dos células vecinas. 1) La lámina media 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-esterificación 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.

La degradación de la estructura de la pared celular requiere de la participación ordenada y escalonada de una serie de enzimas (hidrolasas, transglicosilasas, liasas etc) que reconocen su propio sustrato específico. Así, la acción de unas enzimas deja expuesto el sustrato de las siguientes. Una de las primeras enzimas que actúan en esta degradación son las expansinas, cuya actividad se ha detectado a lo largo del proceso de maduración. Hasta siete expansinas diferentes se han identificado en fresa (*FaExp1-7*) (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Las expansinas están íntimamente implicadas en el proceso de reblandecimiento de la fresa, existiendo una correlación directa entre la firmeza del fruto y los niveles de expresión de tres de estas enzimas. De igual forma, variedades de frutos más blandos como Toyonoka presentan mayores niveles de expresión de estas enzimas que otras más duras, como Camarosa y Selva (Dotto *et al.*, 2006).

Estudios transcriptómicos entre variedades de diferente firmeza han reportado diferencias en la expresión de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular (Salentijn *et al.*, 2003). Entre ellas, *FaPG* (poligalacturonasa), que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha(1-4)$  entre los residuos de ácido galacturónico de los homogalacturanos, presenta mayor actividad enzimática en el cultivar más blando (Toyonoka) que en cultivares más duros, donde su actividad es menor a lo largo de la maduración (Zhou *et al.*, 2015). La expresión de la cinamoil CoA-reductasa (*FaCCR*) y cinamil alcohol deshidrogenasa (*FaCAD*), ambas implicadas en la biosíntesis de lignina, aumenta (más de 20 veces) en frutos blandos de la variedad Gorella, mientras que, en variedades más duras como Holyday, no se produce un incremento de expresión tan brusco. Ambas enzimas catalizan diferentes etapas de la síntesis de lignina y sus diferencias de expresión pueden traducirse en diferencias en la composición de lignina. Teniendo en cuenta que la lignina es un componente principal del tejido vascular y que está asociada con la textura del fruto, las diferencias en su contenido y composición pueden ser importantes al determinar el grado de firmeza del fruto (Jewell *et al.*, 1973; Aharoni *et al.*, 2002b). También, ha sido caracterizada una peroxidasa, *FaPOD27*, como una enzima clave en la biosíntesis de lignina que podría usarse como herramienta biotecnológica en la mejora de la firmeza de la fresa (Yeh *et al.*, 2014).

Otra enzima relacionada con la pectina es *FaPL* (pectato liasa). La expresión de diferentes *FaPLs* incrementa a lo largo del proceso de maduración. Tres *FaPLs* han sido identificadas, aunque solo una es específica del receptáculo y de maduración (Medina-Escobar *et al.*, 1997, Benítez-Burraco *et al.*, 2003, Severo *et al.*, 2011). El silenciamiento mediante RNA interferente de *FaPG* y *FaPL* resultó en frutos más duros. Sin embargo, las líneas de silenciamiento de *FaPG* mostraron niveles mayores de dureza, sugiriendo un papel preponderante de esta enzima sobre *FaPL* (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002; Posé *et al.*, 2013).

Por otro lado, las pectín-metilesterasas (FaPMEs) realizan una doble función, alterando el nivel de metil-esterificación de las pectinas y moviendo grupos acilo de una pectina a otra. La de-esterificación de las pectinas es un paso crucial para permitir el acceso de otras enzimas como las PGs (Moya-Leon *et al.*, 2019). La actividad de las PME se concentra al final del desarrollo y al inicio de la maduración, siendo máxima en la etapa de transición entre verde y rojo. De esta manera, se considera que la acción de las FaPMEs es el desencadenante del resto de reacciones que ocurrirán a continuación. El metabolismo de las pectinas presenta una organización sincronizada entre enzimas a lo largo de la maduración, donde PME actúa en primer lugar, dejando paso a PG y PL (Moya-León *et al.*, 2019) (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de expresión de enzimas relacionadas en la degradación de la pared celular durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa. Extraído de Moya-León *et al.*, 2019.

Por otro lado, las ramnogalacturonato liasas catalizan la ruptura de los enlaces  $\alpha(1-4)$  entre la ramnosa y el ácido galacturónico. Tan solo una enzima de este tipo, FaRGL, ha sido caracterizada en fresa, presentando un patrón de expresión claramente relacionado con la maduración. Su silenciamiento redujo la disolución de la lámina media en frutos de fresa (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013).

Se ha identificado la capacidad de CBMFaEXP2 (Carbohydrate Binding Module Expansin 2) de modificar la pared celular de *A. thaliana* (Nardi *et al.*, 2015). Las CBMs se tratan de dominios auxiliares con capacidad de plegamiento autónomo y con capacidad de reconocimiento y unión específica a carbohidratos (Boraston *et al.*, 2004). CBMFaEXP2 presenta capacidad de unión a diferentes sustratos como son la celulosa microcristalina, xilanos y pectinas *in vitro* 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* sobreexpresando *CBMFaEXP2*, presentan mayor tamaño, así como una pared celular más gruesa y mayor contenido de pectinas que las plantas control. Adicionalmente, estas plantas tenían menor actividad de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular como son PG,  $\beta$ -Gal y  $\beta$ -Xyl. Paralelamente, y como consecuencia de la mayor integridad de la pared, estas plantas transgénicas presentaron mayor resistencia frente al hongo *Botrytis cinérea* (Nardi *et al.*, 2015).

## 5.2. Cambios microscópicos

Como se ha indicado previamente, en las primeras fases del desarrollo del fruto, se produce un crecimiento inicial del receptáculo debido principalmente a la división celular (Knee *et al.*, 1977). Este proceso está acompañado de cambios importantes en la pared celular y en las estructuras subcelulares. En los primeros estadios del desarrollo, las células presentan una densa pared celular y vacuolas pequeñas, los plastos almacenan grandes concentraciones de almidón y el aparato de Golgi y los ribosomas son abundantes. Durante el desarrollo, y cuando el fruto aumenta de tamaño, las paredes celulares se engrosan, aunque presentan mayor difusión, lo que facilita el intercambio de compuestos. Además, el almidón almacenado en los plastos es hidrolizado completamente, lo que aporta energía y metabolitos para las fases de proliferación y elongación celular (Knee *et al.*, 1977).

Durante la maduración, los plastos degeneran, pero no llegan a transformarse en cromoplastos, mientras que las mitocondrias siguen siendo completamente funcionales. Este proceso se caracteriza por un aumento de la hidratación del fruto, que acumula grandes cantidades de agua en las vacuolas, así como una mayor solubilidad de la lámina media y la matriz celular, lo que conlleva un reblandecimiento del fruto (Knee *et al.*, 1977). La lámina media de las células del parénquima cortical se degrada ampliamente durante la maduración del fruto, lo que provoca un aumento del espacio intercelular, disminuyendo el área de contacto entre células (Perkins-Veazie, 1995; Redgwell *et al.*, 1997; Harker *et al.*, 2000; Paniagua *et al.*, 2014). Molecularmente, los cambios más importantes en la pared celular a lo largo de la maduración se producen en la fracción de pectina soluble, que aumenta del 30% al 65% del total en el fruto maduro (Huber, 1984).

### 5.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor

La compleja composición de compuestos volátiles y no volátiles, como azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y taninos son los que otorgan el sabor del fruto.

## ***Carbohidratos***

Los componentes solubles principales en el receptáculo de fresa son los carbohidratos. No solo suministran la energía necesaria para la maquinaria celular, sino que tienen un papel determinante en el sabor final del fruto. Aproximadamente, seis días después de la polinización se comienzan a almacenar asimilados fotosintéticos en el receptáculo (Manning, 1993; Darnell y Martin, 1988). La sacarosa es el principal compuesto glucídico que se almacena en el receptáculo, actuando como sustrato metabólico en diferentes rutas como la biosíntesis de otros glúcidos complejos de almacenamiento (Lis y Antoszewski, 1979).

Los transportadores de sacarosa identificados en fresa, *FaSUT1-7*, facilitan la entrada de este azúcar a la célula a través del apoplasto (Ofosu-Anim y Yamaki, 1994, Jia *et al.*, 2013). La mayor parte de la sacarosa es hidrolizada en fructosa y glucosa por acción de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa (Forney y Breen, 1986). Al principio del desarrollo, los niveles de sacarosa son bajos, aumentan rápidamente hasta alcanzar su máximo en el estadio intermedio y disminuyen de nuevo en estadio rojo. Esta disminución conlleva un aumento en los niveles de glucosa y fructosa, que son los azúcares más abundantes en el fruto maduro (Forney y Breen, 1986). En estos frutos, glucosa y fructosa constituyen aproximadamente el 80% del total de azúcares, llegando a concentraciones de entre 2-2.5g/100 g de peso fresco (Ornelas-Paz *et al.*, 2013). El resto de azúcares que se encuentran en menor concentración son, entre otros, sacarosa, sorbitol, xilitol y xilosa (Makinen y Söderling, 1980). Con relación a los glúcidos que presentan menor concentración, el sorbitol es el más estudiado. Se han identificado genes implicados en su síntesis, como sorbitol deshidrogenasa (*FaSDH*) y sorbitol deshidrogenasa-6-fosfato (*FaS6PDH*). Sin embargo, solo se ha podido identificar actividad enzimática de *FaSDH*, tanto en fruto como en hoja (Duangrisai *et al.*, 2007). La concentración de sacarosa desencadena el proceso de maduración, mediado por un incremento en el contenido de ABA (Ofosu-Anim y Yamaki, 1994; Jia *et al.*, 2013). Las hormonas juegan un papel importante en la captación de azúcares durante la maduración, tanto auxinas como ABA estimulan la incorporación de azúcares al receptáculo, aunque de maneras diferentes. ABA promueve el incremento en los procesos de difusión, mientras que las auxinas promueven la incorporación por transporte activo y por difusión (Ofosu-Anim *et al.*, 1996).

Como principal glúcido de reserva en plantas se encuentra el almidón, que se sintetiza a partir de monómeros de glucosa en una reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa. Las subunidades mayores (*FagpL1* y *FagpL2*) y menor (*FagpS*) han sido identificadas en fresa. La expresión génica de *FagpL1* y *FagpS* es elevada y constante en el desarrollo y maduración del fruto, mientras que *FagpL2* presenta una expresión baja y específica de hojas (Park y Kim, 2007).

El silenciamiento de *FagpS* consiguió disminuir el contenido de almidón y aumentar el de sólidos solubles en plantas transgénicas (Park *et al.*, 2006). Se ha identificado la actividad de enzimas clave en el metabolismo de azúcares como son la invertasa ácida soluble, sacarosa sintasa, hexoquinasa y fructoquinasa, presentando diferentes patrones de actividad en el desarrollo y maduración (Xie *et al.*, 2007).

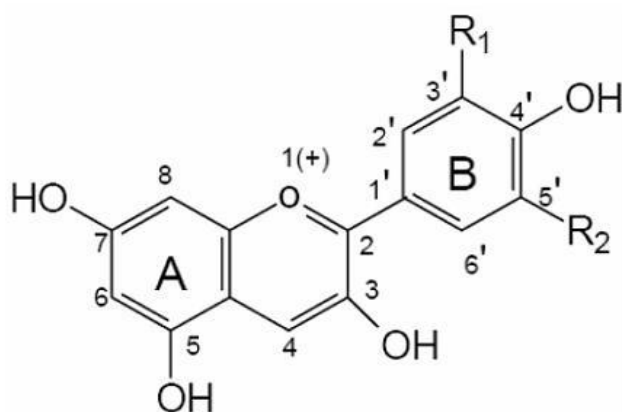
### ***Ácidos orgánicos***

Otro de los factores determinantes del sabor de la fruta es la concentración de ácidos orgánicos. La concentración de estos ácidos no solo determina el pH del fruto, sino que condiciona la estabilidad de los compuestos que dan color, inhibe la actividad de ciertas enzimas e incluso modifica la textura de este, ya que afectan a las propiedades de las pectinas. Los ácidos orgánicos que se encuentran en mayor concentración en el fruto son los derivados del ciclo de Krebs. Mientras que los ácidos no volátiles determinan la acidez final del fruto, los ácidos volátiles contribuyen mayoritariamente en el aroma del fruto (Mussinan y Walradt, 1975). Se ha determinado el contenido de ácido cítrico, málico y ascórbico, ácidos mayoritarios en el fruto durante el proceso de maduración. El ácido málico no altera su concentración durante la maduración mientras que el ácido cítrico la disminuye y el ácido ascórbico aumenta (Kafkas *et al.*, 2007; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). La alta concentración de ácido ascórbico otorga a la fresa grandes efectos beneficiosos sobre la salud, aunque hay que tener en cuenta que la concentración de este ácido es dependiente del cultivar y del tiempo de recogida del fruto (Pincemail *et al.*, 2012; Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

### ***Compuestos fenólicos***

Los compuestos fenólicos quizás engloben al conjunto de compuestos más diversos del fruto de fresa. Dentro de esta categoría se encuentran los polifenoles, las proantocianidinas (taninos condensados) y ésteres de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. En los primeros estadios de desarrollo del fruto, la concentración de los compuestos fenólicos es alta y ésta disminuye a lo largo de la maduración (Spayd y Morris, 1981). Los taninos condensados, que se concentran en los primeros estadios del desarrollo, son responsables de la astringencia del fruto, principalmente por la interacción de estos con las proteínas y mucopolisacáridos de la boca (Ozawa *et al.*, 1987), mientras que las flavonas otorgan el amargor que presentan los frutos verdes (Ferrer, 1997). Por otro lado, los ácidos fenólicos proporcionan acidez al fruto y derivan de la fenilalanina por la vía de los ácidos cumárico y cinámico, siendo el cafeico el de mayor concentración

Otro grupo de compuestos fenólicos de gran importancia en el fruto de fresa son las antocianinas. Son derivadas de una serie de reacciones que parten de fenilalanina como precursor. Son unos de los compuestos más estudiados del fruto ya que son responsables del color rojo del mismo. La antocianina con mayor concentración es la pelargonidina-3-glucosido, seguida de su derivado la pelargonidina-(6-malonil)-3-glucósido. En menor concentración aparecen la cianidina-3-glucósido y su derivado malonilo (Lopes da Silva *et al.*, 2002; Crecente-Campo *et al.*, 2012). El color rojo brillante del fruto se correlaciona positivamente con el contenido de pelargonidina-3-glucósido (Crecente-Campo *et al.*, 2012). No obstante, el color que aportan las antocianinas depende del patrón de hidroxilación de su anillo B. Por otro lado, cabe destacar el comportamiento del contenido de flavonoles totales en el fruto, que desciende a lo largo del proceso de maduración. De esta familia, el flavonol con mayor concentración en fresa es la quercitina-3-glucurónido, seguido por el kaempferol y sus derivados (Lopez da Silva *et al.*, 2002).



Aglicona	Substitución		$\lambda_{max}$ (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

**Figura 12.** Esquema químico de las diferentes antocianinas. Dependiendo de las sustituciones que se presenten en el anillo B, el compuesto resultante presentará un patrón UV diferente y, por lo tanto, un color diferente. Extraído de Durst y Wrolstad, 2001.

### Compuestos volátiles

La intensidad del sabor del fruto de fresa depende en gran medida de la percepción olfatoria retronasal de los compuestos volátiles. Pese a suponer tan solo un 0,001-0,01% del peso fresco del fruto, estos contribuyen a la intensidad y percepción sensorial de la acidez y dulzura del fruto de forma determinante (Larsen y Poll, 1990). El aroma del fruto de fresa no es únicamente una característica propia del fruto, sino que es utilizado como un importante aditivo



industrial en otros productos (Hancock, 1999). Mas de 360 compuestos volátiles han sido identificados en el fruto de fresa, incluyendo ésteres, alcoholes, cetonas, furanos, terpenos, aldehídos y compuestos sulfurados (Zabetakis y Holden, 1997; Schwieterman *et al.*, 2014). El tipo y la concentración de compuestos volátiles depende, en gran medida, del grado de maduración y del cultivar analizado. Aun así, los ésteres son los volátiles más numerosos, hasta 131 han sido identificados (Jetti *et al.*, 2007), mientras que el resto de compuestos presentan concentraciones más bajas. Las diferencias de concentración en estos compuestos determinan cambios significativos en el aroma de la fruta (Yan *et al.*, 2018). Así, la concentración de cada uno de los compuestos genera una huella identificativa de cada cultivar y especie, lo que ha sido objeto de diversas investigaciones (Larsen y Poll, 1992; Larsen *et al.*, 1992). Las especies silvestres, como *F. vesca* y *F. virginiana*, presentan un aroma más fuerte que las cultivadas. *F. vesca* contiene concentraciones altas de acetato de etilo, pero bajas de metil-butirato, etil-butirato y furanona; mientras que *F. nilgerrensis* presenta altas concentraciones de etil-acetato y furanona, pero bajas de metil-butirato y etil-butirato (Hirivi y Honkanen, 1982).

En la especie silvestre *F. vesca* se han identificado compuestos clave en el aroma del fruto derivados de los fenilpropanoides. Estos incluyen acetatos de alcoholes de hidroxicinamoil y fenilpropanos como eugenol e isoeugenol (Pyssalo *et al.*, 1979; Ulrich *et al.*, 1995; 2007). La producción de eugenol está bien estudiada y es superior en *F. vesca* que en la variedad cultivada *F. ananassa* (Pyssalo *et al.*, 1979; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). Se han identificado dos enzimas eugenol sintasa con capacidad de sintetizar eugenol *in vitro* usando coniferil acetato como sustrato. Estas enzimas presentan patrones de expresión paralelos al incremento del contenido de eugenol en el aquenio (*FaEGS1*) y en el receptáculo (*FaEGS2*) (Aragüaez *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de la SAAT, que codifica una enzima alcohol-acil-transferasa de fresa, es específica de receptáculo, aumenta a lo largo de la maduración y 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). SAAT cataliza la reacción usando como receptor preferente alcoholes alifáticos de cadena media, ya que presenta actividades insignificantes con alcoholes aromáticos o monoterpenos. Sin embargo, en *F. vesca* se ha identificado una proteína AAT (VAAT) con actividad distinta a la de SAAT. Esta enzima presenta mayor actividad con alcoholes de cadena corta, al contrario que SAAT (Beekwilder *et al.*, 2004). Esta diferencia de actividad explicaría la diferente composición de volátiles en ambas especies. Estudios posteriores han identificado otra AAT, denominada FaAAT2, con patrón de expresión génico relacionado con la maduración del fruto (Cumplido-Laso *et al.*, 2012). FaAAT2 presenta actividad enzimática con alcoholes de diferentes tamaños (de 1 a 8 carbonos) usando

acetil-CoA como donante preferente. El silenciamiento transitorio mediante ARNi redujo la producción de ésteres volátiles, sugiriendo un papel fundamental de FaAAT2 en la producción de ésteres implicados en el aroma final del fruto (Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

Los ésteres producidos por las AAT son degradados por la acción de las carboxilesterasas (CXE). Estas enzimas degradan los ésteres para formar los correspondientes alcoholes y ácidos carboxílicos. En fresa se ha identificado una carboxilesterasa cuya expresión está relacionada con el proceso de maduración del fruto de fresa. Su caracterización enzimática *in vitro* determinó que FaCXE2 presenta mayor afinidad por ésteres de cadena larga. Además, el silenciamiento transitorio de esta enzima mediante ARNi redujo el contenido de ésteres en el fruto e incrementó el de ciertos alcoholes (Martínez-Rivas *et al.*, *unpublished*).

Aunque no ha sido caracterizada enzimáticamente, se ha propuesto que la enzima piruvato descarboxilasa participa en la formación del aroma a través de su papel en la fermentación etanólica, ya que la expresión del gen está asociada al proceso de maduración y es regulada por hormonas (Moyano *et al.*, 2004).

Los terpenoides son otros compuestos volátiles que participan en el aroma del fruto, pudiendo suponer hasta un 20% del total (Loughrin y Kasperbauer, 2002). Estos compuestos son derivados de la vía del mevalonato y/o de la plastidial del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Ambas rutas producen geranil difosfato, precursor de monoterpenos, y farnesil difosfato, precursor de diterpenos y carotenoides. En receptáculo, se ha identificado una nerolidol sintasa responsable de la síntesis de mono y sesquiterpenos. Este gen es específico de receptáculo y solo se encuentra en las variedades octoploides cultivadas y no en las silvestres, lo que explicaría que compuestos como linalool y nerolidol se encuentren solo en las especies cultivadas (Aharoni *et al.*, 2004). Otra diferencia entre especies cultivadas y silvestres radica en la presencia o ausencia de genes que codifican para una terpeno sintasa. En *F. vesca*, esta enzima produce  $\alpha$ -pineno que, tras la acción de una hidrolasa, produce mirtenol. Sin embargo, en *F. ananassa* la ausencia de terpeno sintasa impide estas reacciones, lo que produce cambios en el sabor de la fruta (Aharoni *et al.*, 2004). Esta ausencia parece deberse a una inserción en el gen que codifica la enzima aparecida, probablemente, en algún momento del proceso de domesticación de la fresa (Aharoni *et al.*, 2004).

El aroma del fruto es una mezcla compleja de diferentes compuestos (Tabla 5). El recuerdo afrutado lo otorgan diferentes ésteres, como el etil-butanoato, hexil-butanoato y el metil 2-metilbutanoato, el olor a “verde” producido por Z-3-hexenal, dulce por ácido butanoico y 2-metilbutanoico, melocotón por decalacatona y caramelo por [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). De estos, destaca el HDMF, cuya concentración aumenta a lo largo de la maduración alcanzando la concentración más alta en fruto maduro, aunque es rápidamente metalizado a su derivado HDMF-glucósido (Pérez *et al.*, 1996; Roscher *et al.*, 1998). El elevado número de compuestos relacionados con el aroma del fruto de fresa sugiere que las enzimas involucradas podrían ser multifuncionales, lo que evitaría un gasto extra de energía en la síntesis de proteínas nuevas. No obstante, esto también podría ser un reflejo de la falta de especificidad de algunas enzimas como reductasas, esterasas, oxidasas, etc., implicadas en la producción de numerosos compuestos involucrados en el aroma del fruto.

**Tabla 5.** *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 $\alpha$ -Terpineol
Furanonas	Furaneol
Dionas de bajo peso molecular	Diacetil
Derivados bencénicos	Benzaldehído
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

### 5.2.2. Metabolismo de los fenilpropanoides: aparición del color

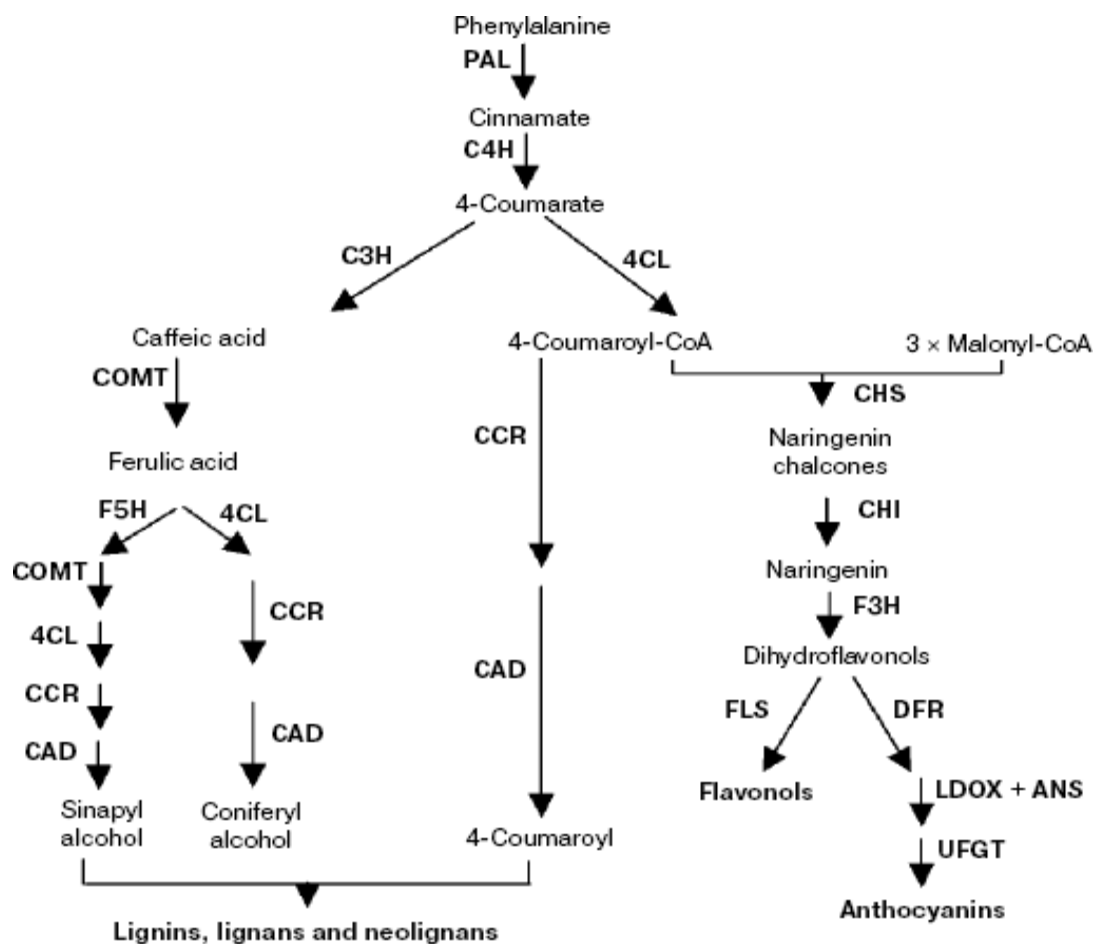
Uno de los cambios más importantes que se producen en el fruto de fresa durante la maduración es la transición del color verde de los estadios del inicio del desarrollo al rojo presente en los frutos maduros. Este cambio es debido a la degradación de las clorofilas y a la consecuente síntesis de antocianinas que se almacenan en las grandes vacuolas presentes en las células del fruto maduro (Timberlake, 1981; Perkins-Veazie, 1995). La síntesis de antocianinas comienza en

el estadio blanco de desarrollo y se produce a partir de fenilpropanoides y flavonoides por la vía del ácido siquímico (Woodward, 1972, Harbone, 1973). La unión de azúcares en diferentes posiciones a la molécula de antocianina dará lugar a los antocianos, que además pueden acetilarse con diferentes ácidos fenólicos para dar lugar a complejos pigmentos. Así, en un fenómeno denominado co-pigmentación, las antocianinas forman complejos con las flavononas produciendo un efecto crómico que cubre el rango del rojo al azul (Asen *et al.*, 1972). La antocianina que presenta mayor concentración en fresa es la pelargonidina-3-glucósido, que puede llegar a suponer el 90% del total (Wrolstad *et al.*, 1970; Green, 1971; Kalt *et al.*, 1993). También se han encontrado, aunque en menor concentración, cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995; Zhang *et al.*, 2010). La variabilidad tanto en concentración como en composición de las antocianinas es amplia entre las diferentes variedades de fresa (Bakker *et al.*, 1994). Todos estos metabolitos secundarios han adquirido 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).

La acumulación de antocianinas es uno de los rasgos más importantes que convierte a la fresa en un producto atractivo para el consumidor. La síntesis de los fenilpropanoides comienza a partir del aminoácido fenilalanina, en una reacción secuencial catalizada por fenilalanina amonio-liasa (PAL), la ácido cinámico-4-hidroxilasa (C4H) y la *p*-coumarato:CoA ligasa (4CL). En estadios tempranos del desarrollo, la actividad PAL está relacionada con la síntesis de proantocianidinas (PA) (Cheng y Breen, 1991). La concentración de antocianinas está correlacionada con la expresión del gen *FaPAL6* de manera que aquellos cultivares que presentan mayor expresión de este gen también presentan mayor concentración de antocianinas (Pombo *et al.*, 2011). En esta parte inicial de la ruta, los compuestos sintetizados pueden ser usados en la síntesis de flavonoides y/o lignina (Figura 13). Una serie de enzimas multifuncionales como son la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), la cumarílico CoA reductasa (CCR), y la peroxidasa FaPOD27 están implicadas 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; Yeh *et al.*, 2014).

Catalizando los primeros pasos específicos de la ruta de los flavonoides se encuentran dos enzimas ampliamente estudiadas, la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Figura 13). El silenciamiento de la expresión de *FaCHS* produce frutos con niveles reducidos de antocianinas y flavonoides, lo que indica el papel clave de esta enzima en la maduración del fruto (Hoffmann *et al.*, 2006; Lunkenbein *et al.*, 2006). El resto de enzimas implicadas en la ruta, como son la dihidroflavonol reductasa (DFR) (Moyano *et al.*, 1998; Hirner *et al.*, 2001; Miosic *et al.*, 2014), la flavonol 3-hidroxilasa (F3H), la chalcona reductasa (CHR) (Manning, 1998), la UDP-

glucosiltransferasa (Griesser *et al.*, 2008) y la antocianina malonil transferasa (Davik *et al.*, 2020) presentan un perfil de expresión génica claramente relacionado con la maduración del fruto y además están reguladas negativamente por auxinas y positivamente por ABA (Wilkinson *et al.*, 1995; Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998; Griesser *et al.*, 2008; Davik *et al.*, 2020).



**Figura 13.** Diagrama de las rutas de biosíntesis comprometidas con el metabolismo de los fenilpropanoides. (Extraído de Du *et al.*, 2009).

La concentración y composición de flavonoides en los frutos depende de diversos factores, tanto genéticos como ambientales, así como de la manipulación postcosecha, que puede afectar ampliamente a la composición final (Bakker *et al.*, 1994; Häkkinen *et al.*, 2000; Wang y Lin, 2000; Anttonen *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008; Dragišić Maksimović *et al.*, 2015). En los primeros estadios del desarrollo, entre 10-15 días después de la antesis, se observa un aumento en la concentración y actividad enzimática asociada a flavan-3-ol y, entre 15-25 días después, un segundo pico de expresión relacionada con la síntesis de antocianos, principalmente pelargonidina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995).

La coloración del fruto es uno de los aspectos más llamativos para el consumidor haciendo de este proceso uno de los más estudiados en fresa debido a su repercusión económica.

La regulación del proceso de síntesis de fenilpropanoides por diversos factores de transcripción ha sido ampliamente descrita. Dentro de los factores de transcripción que regulan el proceso de maduración, los de tipo MYB han sido los que han recibido mayor atención. *FaMYB1* y *FaMYB10* codifican dos factores de transcripción de tipo MYB 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). De igual manera, *FaMYB123*, objeto de estudio en esta tesis doctoral, controla la síntesis de productos finales de la ruta de las antocianinas y fenilpropanoides (Martínez Rivas *et al.*, *unpublished*). También, han sido descritos dos factores de transcripción de tipo MADS-box, *FaMADS9*, perteneciente al grupo *SEPALLATA* (Seymour *et al.*, 2011), y *FaSHP* (*SHATTERPROOF*) (Daminato *et al.*, 2013), que también regulan procesos relacionados con la formación de color. 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 negativa por auxinas y positiva por ABA.

La sobreexpresión de *FaMYB1* en hojas de tabaco (Aharoni *et al.*, 2001) dio lugar a la supresión de la síntesis 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 ARNi 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 fenilpropanoides durante la maduración de la fresa. Debido a este papel clave que juega *FaMYB10*, este FT ha sido objeto de diversos estudios funcionales. Se ha descubierto que, en variedades de frutos de color blanco, la secuencia génica de este gen presenta una inserción de 8 nucleótidos en la parte codificante del extremo carboxilo de la proteína, lo que genera un codón “*stop*” prematuro. Las variedades blancas estudiadas, presentaban esta inserción que sintetiza una proteína incapaz de unirse a complejos MBW, típicos en las interacciones de los FTs tipo MYB (Wang *et al.*, 2019). Recientemente, Zhang *et al.*, (2020) ha descrito la capacidad de un FT de tipo RAV (*Related to ABI3/Viviparous 1*) para activar la transcripción de *FaMYB10* mediante la unión a su promotor. La sobreexpresión de este FT resultó en un incremento de los niveles transcripcionales de *FaMYB10*, mientras que el silenciamiento los redujo considerablemente. Esto fue además acompañado de un incremento y disminución, respectivamente, de los niveles de antocianinas. Estos datos demostraron que *FaRAVI* estimula la acumulación de antocianinas debido a la regulación de *FaMYB10* (Zhang *et al.*, 2020).

Otro FT de tipo MYB, FaGAMYB, ha sido identificado en fresa. Su silenciamiento provocó un retraso en la maduración del fruto, inhibiendo la producción de color rojo. Además, se redujo la síntesis de ABA y de sacarosa, lo cual sugiere que este FT actúa corriente arriba del ABA en la regulación del proceso de maduración. La aplicación exógena de ABA a frutos silenciados rescató el fenotipo rojo del fruto (Vallarino *et al.*, 2015). Por último, el silenciamiento estable de *FaMYB123* en plantas de fresa redujo significativamente el contenido de los productos finales de la ruta de antocianinas y fenilpropanoides, como pelargonidin-(6 malonil)-3-glucósido, cianidin-(6 malonil)-3-glucósido y derivados malonilos de otros compuestos como el kaempferol. Estudios de ARN-seq demostraron que las enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos estaban silenciadas en los frutos transgénicos, tales como *FaANS*, *FaUFGT* y *FaMalTransf*. Esta disminución está acompañada de un aumento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de proantocianidinas, como *FaANR* y *FaLAR*, asociados con una mayor concentración de estos compuestos en los frutos transgénicos (Martínez-Rivas *et al.*, unpublished).

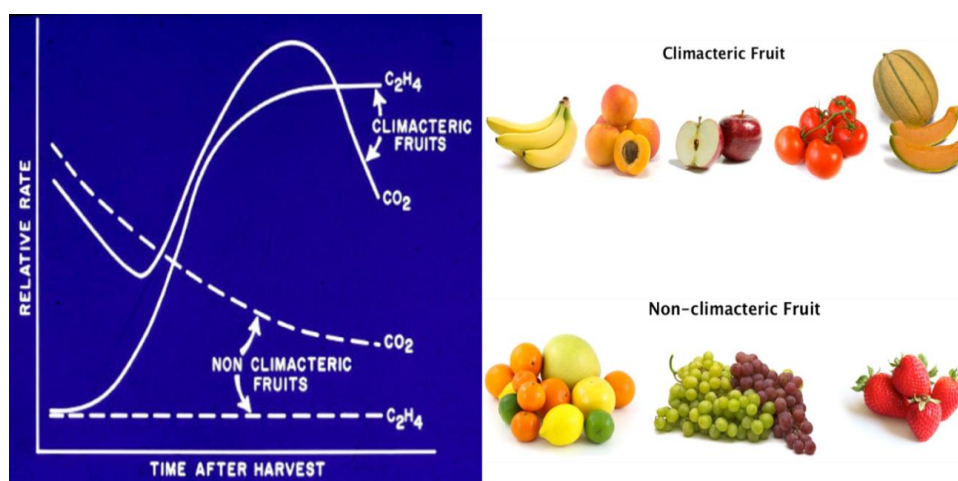
Por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento de *FaMADS9* también provocó una reducción en el contenido de antocianinas totales en el fruto de fresa maduro (Seymour *et al.*, 2011). Por otro lado, en el cv. Camarosa, el silenciamiento de *FaMADS9* no generó cambios fenotípicos visibles que si aparecieron en el cv. Calypso (Vallarino *et al.*, 2020). En este caso, el silenciamiento estable de *FaMADS9* produjo cambios en el contenido de ácidos grasos relacionados con la cutícula del fruto y en la expresión de genes relacionados con este proceso (Vallarino *et al.*, 2020). Asimismo, el silenciamiento de *FaSHP* redujo la expresión de *FaCHS* y de otros FTs relacionados con la síntesis de pigmentos como *FaMYB1*, *FaMYB10* y *FaMADS9*, provocando un retraso en la coloración del fruto (Daminato *et al.*, 2015).

Se han identificado en fresa otros FTs 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 FTs 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 *A. thaliana*, la expresión de los genes de biosíntesis de proantocianidinas es inducida específicamente por un complejo de proteínas compuesto de AtTT2 (AtMYB123), AtTT8 (AtbHLH042) y AtTTG1 (proteína WD40). En fresa, se han identificado los genes ortólogos correspondientes y, 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 de la síntesis de antocianinas (*FaMYB5* y *FabHLH3Δ*) (Schaart *et al.*, 2013).

Estudios de interacción entre proteínas usando el sistema de doble híbrido de levadura han demostrado que FabHLH3 es capaz de unirse a FaMYB9 y a FaMYB123. La interacción con FaMYB9 activaría los genes de síntesis de proantocianidinas, mientras que al interactuar con FaMYB123 se inducirían la síntesis de genes de antocianinas (Schaart *et al.*, 2013, Martínez-Rivas *et al.*, unpublished). 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 y FaSCL8) como posibles 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.

### 5.3. Respiración

De manera general, los frutos se clasifican en climatéricos y no-climatéricos, dependiendo del modelo de respiración que presentan durante su proceso de maduración (Figura 14).



**Figura 14.** 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 aumento 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 14). Este aumento está acompañado de la regulación de genes relacionados con la biosíntesis de etileno en el inicio de la maduración, lo que resulta en la producción auto catalítica de esta hormona (Klee y Clark, 2004). Esta regulación se produce también con la aplicación de etileno exógeno, mientras que la aplicación de etileno a frutos no climatéricos no tiene consecuencia en el proceso de maduración. En los frutos no climatéricos como cítricos, uvas y



fresa, el aumento de etileno está relacionado con otros procesos relacionados con la maduración, como el reblandecimiento, defensa frente a patógenos, cambios nutricionales o degradación de clorofilas (Hobson y Grierson, 1993; Tucker, 1993; Alexander y Grierson, 2002; Giovannoni, 2004). De hecho, se ha observado un pico de etileno antes del envero de la uva, por lo que se sugiere que esta hormona puede jugar también un papel durante el desarrollo de las bayas (Chervin *et al.*, 2004). En fresa, en contraste con los frutos climatéricos, la regulación hormonal del proceso de maduración está relacionada con el balance entre auxinas y ABA (Jia *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012).

Por consiguiente, y teniendo en cuenta el modelo de respiración de cada fruto, se podrían incluir en alguno de estos tres perfiles (Iwata *et al.*, 1969a; 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.

La respiración climatérica aporta energía metabólica adicional, sin embargo, en fresa la maduración no presenta un requerimiento aparente de energía. No obstante, sí se ha descrito un aumento de la actividad ATPasa de hasta 3 veces entre los estadios verde y rojo, lo que podría estar relacionado con un aumento del requerimiento energético necesario para los procesos de transporte que aparecen en esta fase (Ben-Arie y Faust, 1980).

#### **5.4. Choque oxidativo**

Estudios transcriptómicos realizados entre diferentes estadios de maduración de la fresa muestran un incremento de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (Aharoni *et al.*, 2002a). De hecho, se propone que la inducción de genes relacionados con el proceso de maduración en este fruto puede deberse en parte por el estrés oxidativo generado durante la lignificación de sus haces vasculares (Aharoni *et al.*, 2002a). En frutos como el tomate, la maduración conlleva un aumento de procesos oxidativos como la producción de peróxido de hidrógeno, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Jiménez *et al.*, 2002); mientras que en otros frutos se incrementa la expresión de proteínas antioxidantes y enzimas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que apoya que durante este

proceso se requiere un equilibrio entre la producción y eliminación de ROS (Fonseca *et al.*, 2004; Moyle *et al.*, 2005).

En fresa, se ha identificado un aumento en la concentración del anión superóxido a lo largo de la maduración (López-Ráez *et al.*, 2003). Así, se ha identificado una UDP-glucosa:cinamato glucosiltransferasa (FaGT2) implicada en el metabolismo de compuestos naturales y xenobióticos en *F. ananassa*. Esta enzima participa en la detoxificación de compuestos xenobióticos producidos en condiciones de estrés oxidativo (Landmann *et al.*, 2007). Además, la expresión de *FaGAST2* aumenta con el tratamiento con peróxido de hidrógeno y por la infección con hongos, lo que sugiere un papel directo de esta proteína en la eliminación de ROS durante el crecimiento y maduración del fruto y durante la interacción con hongos (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

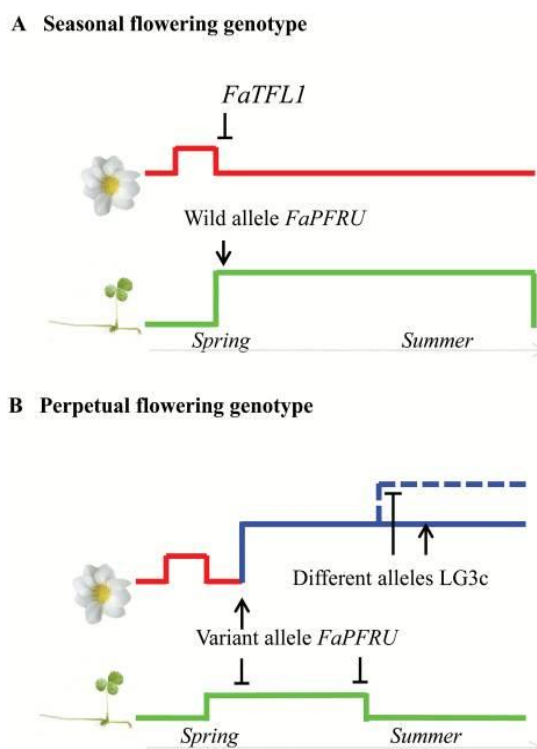
## 6. Control de la floración

Las especies del género *Fragaria* presentan una respuesta floral variable según la temperatura y el número de horas de sol lo que se traduce en la existencia de cultivares de día corto, largo y de fotoperiodo insensible o día neutro (Heide y Sønsteby, 2007). Las hormonas como las auxinas y citoquininas juegan un papel importante en el control de la floración (Hou y Huang, 2005; Eshghi y Tafazoli, 2007). Es probable que las auxinas producidas en hojas jóvenes se transporten a los meristemas apicales regulando su diferenciación a meristemas florales. Esta teoría se apoya en la existencia e identificación de una proteína de unión a auxina (FaABP1) en meristemas de plantas de fresa (Lazarus y MacDonald, 1996).

En oposición a las plantas de *F. vesca* de día corto y floración estacional, existen variedades 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 estas variedades de floración perpetua presentan respuestas medioambientales opuestas en comparación con las plantas de día corto. Dichas variedades son plantas de día largo que florecen rápidamente bajo fotoperiodos largos y altas temperaturas, en contraposición a las plantas de día corto que generalmente 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, de día neutro o “*everbearing*”) están también representados en la fresa cultivada. Estos cultivares han sido considerados 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).

Estudios de genética clásica han revelado que la capacidad de generar flores durante todo el año está bajo el control de un único locus, *FaPFRU* (Gaston *et al.*, 2013). Este locus no es ortólogo de los locus que controlan la floración en la especie diploide *F. vesca*, lo que sugiere que existen diferencias significativas en el control de la floración entre ambas especies. La presencia del locus *FaPFRU* se correlaciona positivamente con la floración y negativamente con la producción de estolones, lo que indica que la diferenciación del meristemo en uno u otro sentido tiene un control fisiológico común. Mediante el estudio de marcadores que cosegregan con *FaPFRU* y, por lo tanto, con la producción continua de flores, se ha podido identificar la región específica del genoma que contiene este QTL (Perrote *et al.*, 2016a). Esta región posee 1108 kb y 234 genes. El estudio pormenorizado de estos genes ha identificado a *flowering locus T* (FT1) como principal regulador de la floración permanente. Los genes de tipo *flowering locus T* codifican una proteína de unión a fosfatidiletanolamina, considerada una proteína clave en la regulación de la floración. De hecho, es la unión de *flowering locus T* o de *terminal flower 1* (*TFL1*) al factor de transcripción *FD*, lo que estimulará la expresión de genes que determinarán la identidad final del meristemo (Figura 15) (Wickland y Hanzawa, 2015).



**Figura 15.** Resumen del control de la floración entre *TFL1*-*FT1*. Extraído de Perrote *et al.*, (2016b).

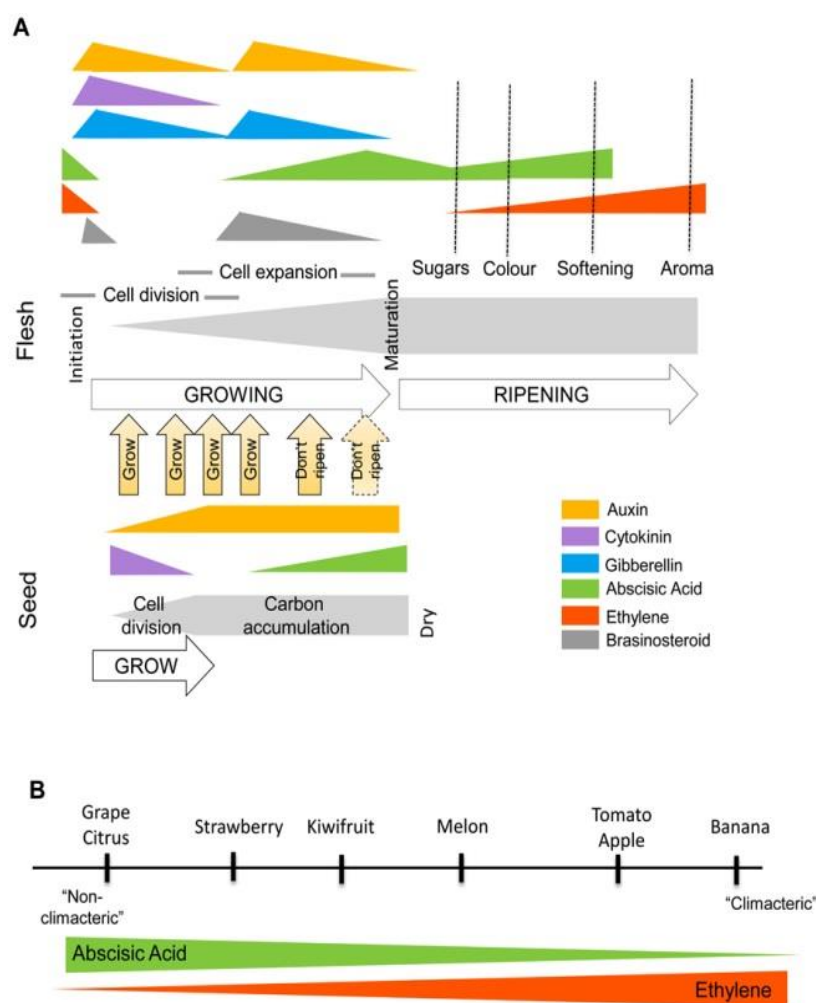
*TFLI* ha sido identificado en *F. vesca* como el gen responsable del *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)*, un locus involucrado en el control de la floración. Una delección de 2 pb en este gen está asociada al fenotipo de floración perpetua en *F. vesca* (Iwata *et al.*, 2012). Además, el silenciamiento mediante ARNi de *FvTFLI* produjo plantas con floración permanente demostrando el papel fundamental de este gen en la floración (Koskela *et al.*, 2012). Así, los resultados obtenidos indicaron que *FvTFLI* es el componente clave de 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 asexual y sexual. Resultados similares se observaron en especies cultivadas de fresa, donde el silenciamiento de *FaTFLI* consiguió eliminar la dependencia lumínica de la floración sin afectar al número de estolones producidos. Esto demuestra que *FaTFLI* actúa como un represor de la floración sin afectar la reproducción vegetativa (Koskela *et al.*, 2016).

En plantas donde la reproducción puede llevarse a cabo de manera sexual o asexual, el meristemo axilar está indiferenciado y puede producir bien un estolón o un ramillete floral. Recientemente, se ha identificado una enzima de la familia GA20ox (oxidasa 20 de giberelina) cuya expresión decide el destino del meristemo. Así, la forma activa de la enzima producirá estolones mientras que la forma inactiva derivará en flores. Su expresión es específica del meristemo axilar se correlaciona con la capacidad de producir estolones en la especie *F. vesca*. Este estudio también demuestra que las giberelinas sintetizadas en el propio meristemo son las que determinan su destino y no son importadas desde otros tejidos (Teneira *et al.*, 2017). Otro gen importante en el proceso de floración es *AGAMOUS (AG)*. Este gen está relacionado con el desarrollo del meristemo, la formación de estambres y la iniciación del carpelo (Battey y Tooke, 2002). En fresa, la expresión de *FaAG1* está limitada a estambres, carpelos y frutos en desarrollo, en consonancia con su papel regulador del desarrollo de los órganos florales (Rosin *et al.*, 2003).

## **7. Regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa**

Las concentraciones hormonales varían ampliamente en los procesos de desarrollo y maduración de múltiples frutos y son estas variaciones las que determinan su programa de desarrollo y maduración (Figura 16). Diferentes estudios han demostrado que durante la formación del fruto de fresa se incrementa la concentración de auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides. Auxinas, giberelinas y brasinoesteroides están relacionados con la regulación del crecimiento, mientras que para desencadenar la maduración se necesita una inhibición del transporte de auxinas desde los aquenios y un aumento de ABA en el fruto. Esta regulación hormonal en fresa es objeto de intensas investigaciones. De hecho, debido a la estructura del fruto,

con los achenios dispuestos en el exterior del receptáculo, se puede estudiar fácilmente su papel en el desarrollo ya que se pueden eliminar causando poco daño al resto del fruto.



**Figura 16.** A. Cambios hormonales que suceden en un fruto genérico durante el desarrollo y maduración. B. Espectro de dependencia al ABA y etileno durante el proceso de maduración. (Extraído de McAtee et al., 2013).

## 7.1. Auxinas

En los primeros estadios del desarrollo del fruto, la auxina ácido 3-indol acético (IAA) se sintetiza en los achenios y posteriormente se exporta al receptáculo (Nitsch, 1950). La forma libre de IAA, considerada como la forma activa, es mayoritaria en el achenio mientras que la forma IAA conjugada con algún tipo de amida es la mayoritaria en el receptáculo (Archbold y Dennis, 1984; Park *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que los niveles de IAA conjugado presentan una distribución bimodal, con un pico de concentración en el receptáculo a los 11 días tras la antesis seguido de un descenso y una posterior acumulación en los últimos estadios de maduración del fruto (Archbold y Dennis, 1984). Recientemente, se han encontrado genes codificantes para enzimas aminotransferasas de triptófano (FaTAA1 y FaTAR2), precursor de la síntesis de auxinas, que presentan alta expresión en estadio rojo. Por otra parte, el estudio del perfil de

expresión de genes de transporte de auxinas indicó que *FaTIR1* tiene un pico de expresión en el estadio rojo, lo que sugiere un papel clave de las auxinas en el proceso de maduración de este estadio del fruto (Estrada-Johnson *et al.*, 2019).

Las auxinas inhiben la maduración en un gran número de frutos no climatéricos (Trainotti *et al.*, 2005). En fresa, a medida que el fruto se desarrolla, las auxinas disminuyen su concentración hasta un nivel que permite desencadenar el proceso de maduración (Manning, 1993; Symons *et al.*, 2012). Así, las auxinas estimulan la elongación del fruto mientras reprimen la maduración. Diversos estudios han demostrado que la retirada de los aquenios estimula la maduración, mientras que el tratamiento exógeno con auxinas sintéticas lo ralentizan (Given *et al.*, 1993; Manning, 1993). Este comportamiento es común en otros frutos no climatéricos como uva, donde la aplicación de auxinas sintéticas retrasa la maduración e inhibe el incremento de los niveles de ABA, sugiriendo que el balance de ambas hormonas controla también el proceso de maduración en uva (Davies *et al.*, 1997).

Múltiples enzimas y factores de transcripción involucrados en los procesos metabólicos propios de la maduración o en su control ven inducida su expresión en frutos verdes al retirar los aquenios, mostrando así una regulación negativa por auxinas. Por ejemplo, enzimas relacionadas con la síntesis de antocianinas como dihidroflavonol reductasa (*FaDFR*) (Moyano *et al.*, 1998) o *FaCHS*, *FaCHI*, *FaANS* (Almeida *et al.*, 2007), relacionadas con la degradación de la pared celular, como pectato liasas (*Fapl*) (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003), endoglucanasas (*FaEGs*) (Harpster *et al.*, 1998; Manning, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001; Spolaore *et al.*, 2003; Palomer *et al.*, 2006), y *FaRGLyase1* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) y genes implicados en otros procesos como *Famyb2*, *FaQR*, *FaHyPRP*, *Fapmsr* (Blanco-Portales *et al.*, 2003; López-Ráez *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006, Lunkenbein *et al.*, 2006; Raab *et al.*, 2006). Sin embargo, hay genes relacionados con la maduración que no están afectados por auxinas, como *FaExp2* y *FaGAST2*, relacionados con la determinación del tamaño de las células durante el desarrollo y maduración del fruto (Aharoni *et al.*, 2002b; Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

## 7.2. Giberelinas y citoquininas

Aunque las auxinas son las hormonas que dominan el proceso de crecimiento y desarrollo de la fresa, sus efectos pueden ser modulados por otras fitohormonas presentes también en el fruto (Lis *et al.*, 1978). Las giberelinas (GAs) son compuestos tetracíclicos diterpenoides implicados en la regulación de procesos de desarrollo que tienen lugar durante el ciclo de vida de la planta, tales como germinación de semillas, división y elongación celular, 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<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>) (Olszewski *et al.*, 2002). La actividad máxima de citoquininas y giberelinas ha sido detectada 7 días después de la antesis, concentrándose principalmente en aquenios. Transcurrido este tiempo, la concentración de citoquininas disminuye en aquenios y receptáculos manteniendo niveles basales hasta que el fruto está maduro (Lis *et al.*, 1978).

Aunque se ha sugerido un papel importante de las GAs en el desarrollo del receptáculo del fruto de fresa, detectando niveles extremadamente altos de GA<sub>4</sub> (Csukasi *et al.*, 2011), la aplicación externa de giberelina GA<sub>3</sub> no estimula el crecimiento del fruto cuando se aplica a frutos a los que se les han retirado los aquenios (Archbold y Dennis, 1984). De igual manera, la aplicación de kinetina no induce crecimiento en tejidos vegetativos de fresa ni aplicada a frutos (Lis y Antoszewski, 1979). Esto apoya la teoría de que las auxinas son las hormonas que controlan el proceso de crecimiento aunque su efecto pueda ser modulado finamente por la acción de otras hormonas. De hecho, se ha comprobado que tanto GAs como citoquininas pueden actuar de forma sinérgica con la auxina 1-naftalenacetamida (1-NAAm) en frutos cultivados *in vitro* promoviendo o suprimiendo su crecimiento y maduración respectivamente (Kano y Asahira, 1978).

La aplicación de GA<sub>3</sub> a frutos inmaduros 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 la enzima PAL, clorofilasa y actividades peroxidasas (Martínez *et al.*, 1996). Por otra parte, dicha aplicación induce la expresión de 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  $\beta$ -xilosidasa (Bustamante *et al.*, 2009). Recientemente, se ha demostrado un nuevo papel de las GAs en la regulación de la maduración del fruto de fresa. Así, la presencia de GA junto con auxinas inhibe la formación de ABA en el receptáculo por dos vías, mediante la inhibición de las enzimas necesarias para su síntesis, como *FaNCED*, y mediante la sobreexpresión de aquellas relacionadas con su degradación como *FaCYP707A4a*. De esta manera, se sugiere que es necesario que tanto GAs como auxinas disminuyan su concentración para promover la síntesis de ABA y desencadenar la maduración del fruto (Liao *et al.*, 2018).

Aparte del papel que puedan desempeñar en el fruto, se ha 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 meristemo. Además, también se ha observado que las GAs parecen intervenir en la diferenciación de las yemas axilares reguladas por el fotoperíodo (Hytönen *et al.*, 2009).

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). Además, se ha demostrado que las variaciones de concentración de las citoquininas durante la inducción floral son importantes para la 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 inducidas en condiciones de noche fría y día corto. Observaron que un incremento del nivel de zeatina y una reducción de la zeatina ribósido justo antes de la iniciación floral y un incremento específico de ribósido zeatina justo después de dicha iniciación, producía la inducción de flores. Estos resultados sugieren que la ribósido zeatina y zeatina juegan un papel importante en la iniciación y el desarrollo floral (Yamasaki y Yamashita, 1993).

### **7.3. Ácido abscísico**

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona relacionada con el crecimiento y desarrollo de las plantas. Aparte de su papel primordial en el control de la maduración del fruto de fresa, en otras especies vegetales 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 de los meristemos. 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 (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996). El incremento de ABA en situaciones de estrés hídrico promueve el cierre de los estomas e inhibe su apertura, lo que es 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). 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 y Lee, 2015).



En fresa, se ha observado que el ABA se acumula tanto en aquenios como en receptáculo a los 20 días postantesis (Archbold y Dennis, 1984; Symons *et al.*, 2012). Este aumento es coincidente con el descenso del nivel de IAA en ambos tejidos, por lo que se propone que la relación ABA/IAA es suficiente para dirigir el cambio genético que ocurre durante la transición de la fase de elongación a la de 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), y también parece adelantar la maduración en frutos *in vivo* (Jia *et al.*, 2011).

Diversos experimentos validan la hipótesis de que el ABA juega un papel crucial en la regulación de la maduración. La aplicación exógena promueve la maduración del fruto, mientras que la aplicación del ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) la retrasó (Jia *et al.*, 2011). Además, el silenciamiento del gen *FaNCEDI*, clave en la biosíntesis de ABA, redujo la concentración de ABA y produjo frutos con un retraso evidente de la maduración, fenotipo que se revertió tras la aplicación posterior de ABA exógeno (Jia *et al.*, 2011). De igual manera, la sobreexpresión de la primera enzima de la ruta de biodegradación de esta hormona, *FvCYP707A4a*, redujo los niveles de ABA en el fruto que condujo a un retraso de la maduración en frutos transgénicos. Estos datos revelan la necesidad de ABA para desencadenar este proceso (Liao *et al.*, 2018).

#### 7.4. Etileno

La concentración de etileno es muy baja en el fruto de fresa y su aplicación exógena no acelera la maduración ni induce la producción autocatalítica de esta hormona. Solo altas dosis de etileno incrementan ligeramente la tasa respiratoria del fruto (Sas *et al.*, 1992; Villareal *et al.*, 2009). Durante el desarrollo del fruto, el etileno incrementa su concentración en el estadio verde, descendiendo ligeramente y volviendo a aumentar una vez se alcanza el día 20 tras la antesis. Posteriormente, vuelve a producirse un aumento de la concentración, que alcanza su máximo con el estadio rojo de maduración (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). El descenso de la concentración de etileno al comienzo de la maduración puede estar debido a la compartimentalización del 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), precursor del etileno, o al descenso de la actividad ACC sintasa o ACC oxidasa (ACO), claves en la síntesis de la hormona (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Esta última hipótesis es la que más posibilidades tienes debido a que el gen *FaACOI* presenta un patrón de expresión coincidente con la acumulación de etileno durante la maduración (Trainotti *et al.*, 2005).

La aplicación exógena de etileno acelera el proceso de senescencia del fruto mientras que el inhibidor del receptor, 1-metilciclopropeno, mantiene la firmeza y reduce la acumulación de

antocianinas y compuestos fenólicos en postcosecha (El-Kazzaz *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 2001; Villareal *et al.*, 2010). Por otro lado, en frutos postcosecha, el tratamiento con etileno ha producido diversos resultados dependiendo de la concentración de etileno aportada. Así, concentraciones muy altas (100  $\mu\text{l/L}$ ) no tuvieron efectos significativos en la fruta (Terry *et al.*, 2007), mientras que concentraciones inferiores a 1  $\mu\text{l/L}$  promovieron su reblandecimiento (Willis y Kim., 1995). Además, el tratamiento con una concentración media de 50  $\mu\text{l/L}$  produjo un aumento de ABA que ayudó a mantener la concentración de compuestos fenólicos y redujo la pérdida de peso fresco (Tosetti *et al.*, 2020). 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; Villarreal *et al.*, 2010; Merchante *et al.*, 2013).

Aunque la aplicación de etileno no tiene un efecto obvio sobre la maduración, sí que afecta a la expresión de diferentes genes relacionados con este proceso. La aplicación de etileno provoca la represión de diferentes genes relacionados con el reblandecimiento del fruto, como  $\beta$ -galactosidasa, pectín metilesterasa y  $\beta$ -xilosidasa y, consecuentemente, la reducción de la actividad enzimática de las enzimas que codifican (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009; Villareal *et al.*, 2010). Sin embargo, no actúa de forma generalizada sobre la expresión de los genes relacionados con la pared, ya que no altera la expresión de otros como la expansina, *FaEXP2* (Civello *et al.*, 1999).

Se han identificado tres receptores de etileno en fresa, *FaETR1*, *FaETR2* y *FaERS1*, cuya expresión es inducida por la aplicación de etileno al fruto (Trainotti *et al.*, 2005). Se ha sobreexpresado ectópicamente el receptor de etileno *etr1-1* de *A. thaliana*, lo que reprimió la expresión de los receptores de fresa. Sin embargo, se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con la pared celular y, más concretamente, con las pectinas. Se encontró inducida la expresión de *FaPEI* mientras que se reprimió *FaPLa* y *FaPG2*, pero no *FaPG1*, indicando que el etileno no afecta de forma similar a todas las enzimas relacionadas con la pared. Esto explicaría por qué el etileno no afecta a la dureza del fruto (Merchante *et al.*, 2013). Por otro lado, el descenso de la percepción de etileno redujo el contenido de ácidos tricarbóxicos (cítrico, succínico y málico) en estadio blanco y de los principales azúcares en el estadio rojo (Merchante *et al.*, 2013). También, se encontró una disminución en la expresión de *FaOMT* relacionada con la síntesis de mesifuranona, lo que se puede asociar con una reducción de la producción de este compuesto (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012).

## 7.5. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son un grupo de hormonas vegetales esteroideas necesarios para el desarrollo normal de las plantas (Davies, 2004). En uva, se ha encontrado un aumento drástico de su concentración al comienzo de la maduración. Además, el tratamiento exógeno con BR promovió la maduración mientras que el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis la retrasó (Symons *et al.*, 2006). Estos resultados indican que los niveles de BRs tienen un claro papel sobre el control de la maduración en frutos no climatéricos. En frutos climatéricos como en tomate, el tratamiento con BRs en frutos insensibles a etileno rescató el fenotipo e incrementó su contenido de carotenoides (Liu *et al.*, 2014).

En fresa, los niveles de BRs más altos se encuentran en flores, siendo la catasterona el BR que presenta mayor concentración. Estos niveles disminuyen durante el desarrollo del fruto alcanzando niveles muy bajos en el estadio rojo (Symons *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito el perfil transcripcional de un receptor de BR, *FaBRI*. Este presenta máxima expresión en los primeros estadios del desarrollo, coincidiendo con la mayor concentración de esta hormona, y una ligera reducción en el estadio rojo y en el proceso de maduración. Aun así, el silenciamiento mediante ARNi del receptor inhibió la maduración del fruto generando frutos de color blanco, lo que sugiere un papel clave de esta hormona en la maduración del fruto. Este fenotipo fue apoyado por el retraso de la maduración provocado con inhibidores competitivos de los receptores de BR (Chai *et al.*, 2013).

## 8. Control epigenético de la maduración

Los cambios en la metilación del ADN han sido relacionados con el control de la maduración en diversos frutos. En eucariotas, la metilación del ADN se define como la adición de grupos metilo en el residuo carboxilo-5 de la citosina, lo que genera 5-metil-citosina. En plantas, la metilación puede ocurrir en tres contextos diferentes, CG, CHG o CHH, donde H es cualquier base menos G. En los contextos simétricos, CG y CHG la metilación es mantenida por las ADN metiltransferasas, siendo las variantes MET 1 y 2 las responsables del contexto CG y las cromometilasas (CMT3), mediante su unión a *kryptonite* (KYP) y SUVH5/6 las encargadas del contexto CHG (Woo *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2014). La metilación *de novo* del ADN así como la metilación en el contexto asimétrico CHH, requiere de un complejo sistema compuesto por los modificadores del nucleosoma DRD1 y DDM1, un pequeño ARN guía de 24 nt y la metiltransferasa *domains rearranged methyltransferase* (DRM2) (Matzke y Mosher, 2014). Este mecanismo, conocido como *RNA directed DNA methylation* (RdDM), es especialmente activo en la metilación de transposones, así como en repeticiones en los promotores, intrones o regiones codificantes de genes (Matzke y Mosher, 2014).

La metilación del ADN es eliminada bien cuando la metilación activa no es funcional o cuando es retirada activamente por la acción de las ADN-demetilasas. Estas enzimas catalizan la eliminación de las citosinas metiladas que son sustituidas por citosinas no metiladas en el ADN. En plantas, *demeter*, *demeter-like* y *repressor of silencing* (DML, DML-like, ROS1), son las encargadas de retirar las citosinas metiladas (Choi *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que el nivel final de metilación en el ADN está determinado por la acción coordinada de las ADN metiltransferasas y demetilosas, donde la expresión de ROS1 puede estar determinada por el nivel de metilación de su promotor (Williams *et al.*, 2015).

Los mayores avances en el control de la maduración por marcas epigenéticas han sido realizados en tomate. En un primer momento, se determinó que el grado de metilación es menor en los frutos maduros que en frutos verdes (Hadfield *et al.*, 1993). Posteriormente, el estudio del gen *Cnr* (*colorless non ripening*, cuyo silenciamiento produce frutos que se mantienen firmes y no acumulan carotenoides, determinó que no existían diferencias en la secuencia génica. Sin embargo, se encontró una región altamente metilada en el promotor del gen y que solo se encontraba en los mutantes inmaduros (Manning *et al.*, 2006). Estos cambios de metilación en el promotor son suficientes para producir el silenciamiento del gen. Posteriormente, se estudiaron los cambios epigenéticos globales durante la maduración del fruto de tomate, observando una pérdida del 30% de metilación en el fruto rojo frente al verde que afectaba a genes claramente relacionados con el proceso de maduración, tanto en la biosíntesis de etileno como en su percepción (Teyssier *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2013). En este caso, es la demetilación de dichos genes la que induce su expresión debido al silenciamiento de una ADN demetilasa (*SIDML2*). Así, este gen, que presenta su pico de expresión durante la maduración, retrasó la maduración del fruto (Liu *et al.*, 2015). De igual manera, haciendo uso de un compuesto químico, la 5-azacitidina (5-AZA), adelantó la maduración del fruto (Zhong *et al.*, 2013).

La 5-AZA es un análogo de la citosina que es metabolizado a 5-aza-2'-deoxicitidina-trifosfato e incorporado a la cadena de ADN durante su replicación. Las bases 5-AZA presentan un átomo de nitrógeno en la posición 5 del anillo pirimidínico. De esta manera, 5-AZA se une covalentemente a las ADN metiltransferasas en el momento en el que estas tratan de añadirle el grupo metilo. Esta unión es reconocida por la maquinaria celular que degrada las enzimas resultando en una pérdida de la metilación del ADN (Vesely and Čihák, 1978; Santi *et al.*, 1984; Stresemann and Lyko, 2008). Este compuesto ha sido ampliamente usado como agente demetilante para estudiar el papel de la metilación génica en el proceso de maduración. La aplicación de este compuesto adelantó la maduración en tomate, manzanas, melocotones y uvas (Ma *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). En melocotón y manzana, el adelanto de la

maduración al tratar con 5-AZA se han relacionado con la demetilación en el promotor del gen MYB10, lo que activa su transcripción y dispara el proceso de maduración.

En fresa, inicialmente se ha descrito un adelanto de la maduración tras la aplicación de 5-AZA aunque aún no existen pruebas funcionales de este adelanto (Zhong *et al.*, 2013). No obstante, en este trabajo se ha demostrado que la inyección del compuesto a frutos de fresa en estadio verde retrasa el proceso de maduración, mantiene a los frutos inmaduros mientras dura el tratamiento y restituye el proceso cuando la aplicación del compuesto cesa. No sólo paraliza el proceso de maduración a nivel de la biosíntesis de color, sino que otros genes relacionados con la degradación de la pared celular y/o la biosíntesis de aromas también fueron silenciados (Martínez-Rivas *et al.*, unpublished). Además, el estudio metabolómico de los frutos tratados con 5-AZA mostró la acumulación de metabolitos característicos de los estadios verdes de desarrollo en la zona tratada y un desequilibrio en el contenido hormonal. Por lo tanto, es posible que la metilación de ciertos genes sea necesaria para desencadenar el proceso de maduración en el fruto de fresa.

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

El desarrollo de las denominadas tecnologías ómicas ha permitido que el número de trabajos centrados en la determinación e identificación de genes diferencialmente expresados aumenten en los últimos años. Desde la aparición de los primeros estudios, en los que se estudiaban poblaciones de ARNm en estadios blanco y rojo de maduración (Manning, 1993), hasta estudios más avanzados con el uso de plataformas de microarray (Medina Puche *et al.*, 2016) o ARN-seq (Sanchez Sevilla *et al.*, 2017), se ha generado una gran colección de datos transcriptómicos que nos permite el acceso a gran información acerca del proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa. De igual manera, se ha desarrollado una base de datos que permite identificar la expresión de un transcrito en diferentes tejidos vegetativos de la planta y en receptáculo (<http://mb3.towson.edu/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

A lo largo del desarrollo y maduración del fruto, se describen tres modelos de evolución de transcritos. El primer grupo se compone de ARNm que aumenta su concentración a lo largo de la maduración, un segundo grupo que disminuye su concentración a lo largo del proceso y un tercero que presentan un pico en el estadio intermedio para declinar en estadio rojo (Veluthambi y Poovaiah, 1984; Reddy *et al.*, 1990; Reddy y Poovaiah, 1990; Manning, 1994). Estos modelos de expresión indican 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 relacionadas con los procesos específicos de maduración. Enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular (Civello *et al.*, 1995), producción de antocianinas (Given *et al.*,

1988a), y metabolismo de la sacarosa (Hubbard *et al.*, 1991) aumentan su actividad durante la maduración del fruto.

También, se ha realizado otra aproximación molecular a través de proteómica cuantitativa mediante el marcaje de péptidos por dimetilación con isótopos estables (Li *et al.*, 2013). Entre las proteínas cuantificadas se observó un incremento de proteínas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides, antocianinas y volátiles, relacionadas con el metabolismo antioxidante, proteínas de respuesta a estrés y formación de alérgenos a lo largo de la maduración (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, sino 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. Además, se han llevado a cabo estudios proteómicos más especializados en rutas metabólicas de especial interés en la maduración del receptáculo. Así, se ha podido relacionar la concentración de diferentes enzimas con su expresión génica y la cantidad de metabolito final. Esto ha permitido identificar enzimas clave en la síntesis de compuestos volátiles (Song *et al.*, 2015a) y de la ruta de producción de fenilpropanoides (Song *et al.*, 2015b).

También, se han caracterizado individualmente un gran número de genes que intervienen en el proceso de maduración del fruto. Se ha profundizado en la función de genes que codifican enzimas relacionadas en la degradación de la pared celular (Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2009), en la biosíntesis de antocianinas y flavonoides (Moyano-Cañete *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2007; Griesser *et al.*, 2007), así como de compuestos volátiles y de otros procesos relacionados con la maduración (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

Durante el proceso de maduración, la reestructuración de la pared celular es uno de los procesos más importantes que sufre el fruto y afecta, fundamentalmente, a su composición pectínica. El reblandecimiento del fruto es una de las principales causas de pérdida de producción y, por lo tanto, un objetivo principal en el estudio de esta fruta. En nuestro grupo de investigación, se han aislado y caracterizado varios genes que codifican pectato liasas (*plA*, *plB* y *plC*) relacionadas con la pérdida de firmeza del fruto durante la maduración (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003). De hecho, su silenciamiento en frutos transgénicos se tradujo en un incremento de su firmeza y en un retraso en su proceso de maduración (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002).

Las poligalacturonasas (PGs) son otro grupo de enzimas relacionadas con la remodelación de la pared celular y que aumentan su expresión a lo largo de la maduración. Como ha sido descrito anteriormente, las PGs son enzimas relacionadas con la degradación de la lámina media. Inicialmente se identificaron dos PGs en fresa y mediante estudios de *northern-blot* se comprobó que *FaPG1* presentaba un pico de expresión en el estadio blanco de maduración (Redondo-Nevado *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios posteriores mediante qRT-PCR certificaron que *FaPG1* mantiene una expresión alta en estadios rojos y posteriores, siendo su expresión superior a la de *FaPG2* (Quesada *et al.*, 2009). El silenciamiento de *FaPG1* en frutos maduros se tradujo en un incremento de su dureza y en cambios en la estructura de su pared (Quesada *et al.*, 2009). Igualmente, el silenciamiento de *FaPG2* también generó frutos con mayor dureza aunque el doble silenciamiento *FaPG1-FaPG2* no presentó un efecto sinérgico sobre la dureza (Paniagua *et al.*, 2020).

Paralelamente, 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.*, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001). Dentro de las endoglucanasas, recientemente se ha caracterizado en profundidad *FaEG1*. Presentando un marcado perfil relacionado con la maduración del fruto, su expresión fue mayor en cultivares con menor dureza, como cv. Monterrey, frente a cultivares de mayor dureza, como cv. Camarosa (Jara *et al.*, 2019).

Otras enzimas caracterizadas son las expansinas. Se han identificado siete expansinas en fresa (*FaEXP1-FaEXP7*) (Harrison *et al.*, 2001). 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 los niveles de expresión de *FaEXP2* y *FaEXP5* y la 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 cultivares más firmes (Selva, Camarosa, Holiday y Elsanta) (Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que las expansinas contribuyen en la maduración del fruto y pueden ser responsables del grado de reblandecimiento en los distintos cultivares de fresa (Dotto *et al.*, 2006). Nuevos estudios han validado estos resultados mostrando que *FaEXP5* presenta un patrón de expresión creciente a lo largo de la maduración relacionado con la pérdida de firmeza en el cv. Camarosa. De igual forma, *FaEXP5* responde de forma positiva al tratamiento con ABA, hormona clave en el control del proceso. El estudio del promotor reveló la presencia de dominios de respuesta a ABA y a auxinas, sugiriendo que ambas hormonas juegan un papel relevante en el control de la expresión de esta enzima (Valenzuela Riffo *et al.*, 2020).

Las PME (pectin metil esterases) catalizan la hidrólisis de los grupos metil éster de las pectinas dando lugar a una desesterificación de la pared celular (Prasanna *et al.*, 2007). El grado de esterificación de la pectina es muy importante, debido a que influye en la actividad de otras enzimas asociadas a la pared como son la PG y las PL (Prasanna *et al.*, 2007). En fresa, se han identificado hasta seis isoformas de esta enzima a partir de una muestra de extracto de pared. Entre ellas, la expresión de *FaPME1* es específica de fruto y está relacionada con la maduración. En cambio, las otras isoformas son específicas de hojas (*FaPME2*) y otros tejidos vegetativos (*FaPME3* y *FaPME4*) (Castillejo *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la expresión de la *FaPE1* es inducida por auxinas, al contrario de otros genes relacionados con la pared celular 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).

Se han analizado plantas transgénicas de fresa de la variedad silvestre *F. vesca* con expresión ectópica de la *FaPME1* procedente de *F. ananassa*. Los frutos obtenidos mostraron cambios en el grado y patrón de esterificación de sus pectinas y también un incremento de la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta a estrés biótico (Osorio *et al.*, 2008). Esto sugiere que la *FaPME1* participa en la metilación de derivados pectínicos oligogalacturónidos (OGA) envueltos en procesos de defensa. De hecho, los frutos transgénicos obtenidos fueron más resistentes a *Botrytis cinerea* que los frutos control (Osorio *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha aislado y caracterizado *FaRGlyase1*, un gen que codifica una ramnogalacturonato liasa que se expresa al mismo tiempo que otras hidrolasas involucradas en la degradación de pectinas (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013). Esta coexpresión apoya la idea de que la degradación enzimática de las paredes celulares del parénquima cortical del fruto maduro influye en el reblandecimiento. Esta enzima 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 de 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).

Otras proteínas que participan en la degradación de la pared celular son las xiloglucan endotransglicosilasas/hidroxilasas (XTH). Estas enzimas se relacionan con el desensamblaje de la matriz celulosa-xiloglucano, contribuyendo al reblandecimiento asociado con la maduración. Se ha reportado la expresión de dos *FaXTH* a lo largo de la maduración del fruto, presentando ambas una mayor expresión en el estadio blanco-intermedio y una reducción en el estadio rojo



(Nardi *et al.*, 2014, Ramos *et al.*, 2018). Además, se ha relacionado una mayor expresión de *FaXTH1* en aquellas variedades que presentan frutos más blandos como cv. Portola y cv. Monterrey (Ramos *et al.*, 2018).

El proceso de maduración de la fresa va acompañado de un aumento del contenido hídrico del fruto. Una de las proteínas más estudiadas en relación con el contenido hídrico son las acuaporinas, que actúan como transportadores de agua a través de la membrana. Cambios en la expresión de genes que codifican acuaporinas durante los procesos de crecimiento y maduración del fruto han sido asociados con un incremento del reblandecimiento del fruto originado por la reducción del turgor celular (Thomas *et al.*, 2006; Saladiè *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2008; 2009). La disminución del turgor es 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 dos acuaporinas (*FaPIP1* y *FaPIP2*) fue mayor en frutos de un cultivar más firme (Camarosa) en comparación con 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 lo que podría estar relacionado con el mantenimiento de la turgencia del fruto (Mut *et al.*, 2008; Alleva *et al.*, 2010).

Se aisló y caracterizó el gen *FaNIP1;1*, que codifica una acuaporina de tipo *nodulin 26-like* y que se expresa a lo largo del proceso de maduración. También, se demostró su incremento de expresión en condiciones de estrés hídrico en frutos. 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). Por otro lado, se ha estudiado el perfil de expresión de varias acuaporinas en una amplia variedad de tejidos vegetativos y durante el proceso de maduración. Así, en cultivares como Elsanta, las acuaporinas de la familia PIP1;1 disminuyeron su expresión durante la maduración, mientras que en cultivares como Toyonaka y Camarosa la aumentaron. En el caso de las proteínas PIP2;1, la expresión es estable en el cv. Elsanta, mientras que en el cv. Camarosa presenta un pico en el estadio blanco para volver a descender en el rojo (Mearlen *et al.*, 2018). Finalmente, la expresión del grupo *FaTIP* fue reprimida a lo largo del proceso de maduración en los diferentes cultivares estudiados. Esto indica que los patrones de expresión son altamente variables según cultivares y que pueden estar asociados a la diferencia en la turgencia de los frutos.

La ruta de biosíntesis de ácido *L*-ascórbico, funcional en el estadio rojo, es aquella que usa el *D*-galacturonato como sustrato. La contribución de otras rutas a la biosíntesis de ácido *L*-ascórbico no ha sido aún descrita. El uso de este intermediario puede estar relacionado con la degradación de la pared celular, ya que este compuesto es uno de los principales componentes de las pectinas. Su degradación estaría catalizada por enzimas como la *D*-galacturonato reductasa (*FaGalUR*), la myo-inositol oxygenasa (*FaMIOX*), y la monodehidroascorbato reductasa (*FaMDHAR*), cuya expresión está correlacionada positivamente con un incremento de *L*-ascórbico durante la maduración del fruto (Agius *et al.*, 2003; Cruz-Rus *et al.*, 2011). Así, el máximo nivel de expresión del gen *FaGalUR* en el estadio rojo coincide con el aumento de solubilidad de las pectinas, debido a la acción de las PL, y con el máximo contenido de ácido ascórbico que se observa en el fruto maduro, lo que apoyaría la ruta propuesta para la biosíntesis del ácido *L*-ascórbico a partir de *D*-galacturonato (Agius *et al.*, 2003). Además, la sobreexpresión del gen de fresa *FaGalUR* en tomate aumentó la capacidad antioxidante total en los frutos transgénicos (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, denominados *early biosynthetic genes*, así como de ANS, UFGT y Malonil-transferasas, que conforman los *late biosynthetic genes* (Gong *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2006; Griesser *et al.*, 2008; Davik *et al.*, 2020). 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 durante el proceso de maduración (Anterola *et al.*, 2002; Medina-Puche *et al.*, 2016). Igualmente, la síntesis de antocianinas durante la maduración parece estar regulada por la síntesis *de novo* de la enzima FaPAL (Hirner *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001), cuya expresión es inhibida por la aplicación de auxinas (Given *et al.*, 1988a). Esta enzima presenta dos picos de expresión, el primero en el estadio verde, cinco días después de la antesis cuando existe un nivel muy alto de fenoles solubles, y un segundo pico aproximadamente 30 días después de la antesis, asociado al estadio rojo del fruto (Cheng y Breen, 1991).

Por otro lado, se ha aislado y caracterizado el gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) que cataliza el último paso de la ruta común a la biosíntesis de antocianinas y taninos condensados (Moyano *et al.*, 1998). *FaDFR* puede jugar un doble papel dirigiendo la ruta hacia cada una de las vías. Este doble papel se sugiere debido a que, aunque presenta su máximo de expresión en el estadio rojo, su expresión se detecta también en frutos en estadio verde. 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 identificado la enzima que cataliza la síntesis de pelargonidina-3-glucosido, la antocianina con mayor concentración en el fruto de fresa. Estudios de especificidad enzimática entre diferentes UDP::glucosiltransferasas identificaron a FaGT1 como la enzima que lleva a cabo este paso. Esta enzima tiene un perfil transcriptómico fuertemente inducible a lo largo de la maduración, alcanzando su máxima expresión en el estadio rojo (Griesser *et al.*, 2008). Por otro lado, estudios de QTL usando variedades de fresa con diferentes concentraciones de antocianinas han permitido identificar varias enzimas potencialmente responsables de la síntesis de compuestos como pelargonidin-(6 malonil)-3-glucósido (Devik *et al.*, 2020).

El proceso de maduración está regulado por una serie de factores de transcripción como *FaMYB1*, *FaMYB10*, *FaMADS9*, *FaSHP* y *FaGAMYB*, así como el recientemente identificado *FaMYB123*, que codifican factores de transcripción de tipo MYB y MADS-box y que 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; Martínez-Rivas *et al.*, unpublished) (Introducción general, apartado 5.2.2). Igualmente, otros genes implicados en procesos específicos de maduración, como la producción de volátiles han sido identificados. Estos genes regularían la producción de volátiles relacionados con la generación del aroma del fruto como *FaOMT*, *FaNES1*, *SAAT*, *FaAAT2*, *FaPDC1* (Aharoni *et al.*, 2000; Aharoni *et al.*, 2004; Moyano *et al.*, 2004; Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

Otro de los procesos relacionados con la maduración es la lignificación de las paredes celulares. En este proceso se ha caracterizado a *FaCAD1*, cuyo perfil de expresión e inmunolocalización de la proteína la relacionan con el proceso de lignificación en frutos y aquenios durante la 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). 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 para la determinación de la firmeza de los frutos de fresa, así como su posible función como componente del mecanismo de defensa del fruto frente a ataques bacterianos (Yeh *et al.*, 2014).

También, se ha identificado a *FaGAST2* (Moyano-Cañete *et al.*, 2013), cuyo perfil transcriptómico presenta un incremento de expresión a lo largo del desarrollo y la maduración del fruto. Aunque *FaGAST2* y *FaGAST1* (de la Fuente *et al.*, 2006) comparten poca homología de secuencia a nivel aminoacídico (31%) y nucleotídico (15%), ambas proteínas contienen un péptido señal y un dominio de tipo GASA altamente conservado en el extremo C-terminal. La expresión de *FaGAST2* no está regulada por GA<sub>3</sub> ni ABA, pero sí por etefón, un generador intracelular de etileno, por condiciones de estrés oxidativo y por infección por *Colletotrichum*, lo que sugiere que *FaGAST2* juega un papel directo en la eliminación de ROS durante el crecimiento y maduración del fruto y en respuesta a estreses bióticos (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Además, la sobreexpresión de *FaGAST2* produjo un retraso en el crecimiento de la planta y frutos de menor tamaño. Los análisis histológicos de estos frutos confirmaron un menor tamaño de las células del parénquima corroborando la hipótesis de que *FaGAST2* está relacionada con la elongación celular y el tamaño final del fruto (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

## **10. Genes implicados en la mejora de fresa**

La familia de las *Rosaceas* presenta una gran diversidad fenotípica debido a que está compuesta por diversas especies. Dentro de sus miembros se incluyen árboles de gran interés, como melocotón, manzana, así como zarzas, rosas, almendras y fresas. Actualmente, y aunque han mejorado las técnicas de obtención de sistemas transgénicos en esta especie, el número de genes funcionalmente caracterizados mediante esta metodología es escaso. 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 en plantas transgénicas es un proceso bastante lento, debido al tiempo necesario para la regeneración de las plantas, aunque proporciona una herramienta muy valiosa para la selección de genes que puedan determinar una mejora cualitativa de los frutos.

### **10.1. Mejora de la planta de fresa frente a plagas y enfermedades**

#### **10.1.1. Resistencia a agentes abióticos**

En su hábitat natural, las plantas de fresa están expuestas a diferentes agentes abióticos como el déficit hídrico, altas temperaturas, salinidad, metales pesados y daños mecánicos. Se estima que estas condiciones pueden causar una reducción del rendimiento de producción de 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 para poder aclarar así cuales son los mecanismos intrínsecos de éstas para poder minimizarlos.

Estudios transcriptómicos mediante ARN-seq en plantas sometidas a estrés por bajas temperaturas revelaron una batería de genes que alteran su expresión en esas circunstancias. Así, 1180 genes se sobreexpresaron, mientras que 1217 disminuyeron su expresión (Zhang *et al.*, 2019). Los estudios funcionales basados en estos datos revelaron que las categorías génicas que mostraron mayores diferencias de expresión fueron las de respuesta mediada por hormonas, biosíntesis de flavonoides y respuesta mediada por proteínas quinasa. Dentro de las hormonas, aparecieron sobreexpresados los genes relacionados con el ABA, mientras que los de respuesta regulados por auxinas se redujeron drásticamente (Zhang *et al.*, 2019). En este sentido, se ha comprobado que la aplicación exógena de ABA desencadena la síntesis de betaína o glicina betaína, lo que aumenta la supervivencia de las plantas en condiciones de congelación y mejora su crecimiento (Rajashekar *et al.*, 1999). Igualmente, en condiciones de estrés osmótico o de sequía también se produce una acumulación significativa de este compuesto en muchas plantas, lo que ha llevado a proponer que su acumulación sea un mecanismo de adaptación medio ambiental a diversas situaciones de estrés (Rajashekar *et al.*, 1999). También, se ha observado una sobreexpresión de la ruta de los flavonoides, indicando que estos compuestos juegan un papel fundamental en la adaptación de la planta a bajas temperaturas (Zhang *et al.*, 2019).

Estudios transcriptómicos en plantas de fresa aclimatadas al frío han permitido identificar varios genes que presentan expresión diferencial a bajas temperatura, *Fcor1*, 2 y 3 (NDong *et al.*, 1997). Mientras que *Fcor1* y 2 presentan expresión en todos los tejidos analizados, *Fcor3* es específico de hojas. El tratamiento con frío aumenta la expresión de una proteína quinasa calcio dependiente (CDPK) expresada en raíces, estolones, meristemos, flores, hojas y frutos a partir del estadio blanco, que sugiere un papel importante de esta proteína en la adaptación al frío (Llop-Tous *et al.*, 2002). Para conferir resistencia al frío en plantas de fresa, también se han utilizado genes foráneos. Por ello ha sido clonado en fresa el factor de transcripción CBF1 que participa en la aclimatación de *A. thaliana* a bajas temperaturas (Owens *et al.*, 2002). Sin embargo, el análisis de los frutos obtenidos a partir de dos líneas transgénicas de fresa sobreexpresando dicho gen no mostró cambios significativos en su tolerancia a la congelación (Owens *et al.*, 2002).

Por otro lado, 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, fue usado para obtener líneas transgénicas de fresa sobreexpresando este gen. Estas plantas presentaron un mayor grado de resistencia al frío y de tolerancia a la congelación (Houde *et al.*, 2004). Además, se ha identificado el promotor *rd29A*, que presenta elementos inducibles por estrés (deshidratación, estrés salino, bajas temperaturas), que unido al gen de arroz *RdreB1B1*, que codifica un FT de tipo DRE (*drought responsive elements*, elementos de respuesta a la deshidratación), también mostró una mejora significativa en la tolerancia al frío de plantas de

fresa (Gu *et al.*, 2013). Así, el análisis transcriptómico de plantas transgénicas transformadas con la construcción *rd29A::RdreB1Bl* y sometidas a condiciones de frío extremo (0°C por 6 horas), mostró un incremento de la expresión de diversos FTs con elementos de respuesta a frío (DRE) en sus promotores. Esto indica una clara respuesta transcriptómica derivada de la acción de *RdreB1Bl*. También, en los estolones de estas plantas, se observó una acumulación de antocianinas acompañada de la sobreexpresión de enzimas relacionadas con esta ruta (Gu *et al.*, 2015). Esta acumulación, a ser compuestos con capacidad antioxidante, puede conllevar ventajas para el crecimiento de la planta y su resistencia a diferentes estreses abióticos (Misyura *et al.*, 2013).

Las temperaturas elevadas constituyen otro de los estreses abióticos más frecuentes a los que se ven sometidas las plantas. Los organismos responden a estas condiciones mediante la síntesis de un grupo específico de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP). En fresa, a partir de una genoteca substractiva de ADNc, se ha aislado el gen *HSP* que muestra una homología significativa de secuencia con la proteína HSP1 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.

Así, el estudio transcriptómico comparativo entre un cultivar que presenta resistencia al calor, cv. R Hope, y otro no termotolerante, cv. Festival, mostró que un gran número de proteínas de la familia *HSP* presentan una mayor expresión en el cultivar resistente al calor. También, se encontró un aumento de alérgenos de la familia *Fraa* a altas temperaturas, pudiendo considerarse la expresión de este gen como marcador de seguridad sanitaria en el futuro, así como marcador para la selección de variedades termotolerantes (Kesici *et al.*, 2020). Otro estudio realizado en plantas de fresa expuestas a estrés térmico ha permitido observar un aumento de la actividad peroxidasa en las plantas sometidas a este estrés, 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. Por otra parte, la sobreexpresión heteróloga de *FaTHSFA2a* y de *FaTHSF1a* en plantas de *Arabidopsis* otorgó mayor resistencia a altas temperaturas. Ambas proteínas consiguieron aumentar la expresión de diversas proteínas HSP en *Arabidopsis*, así como aumentar la viabilidad de las plantas sometidas a altas temperaturas, sugiriendo su posible función en la respuesta al estrés por calor (Liao *et al.*, 2016).

La sequía, así como la salinidad, es otro de los estreses abióticos que más importancia está tomando en este momento. Se realizaron estudios sometiendo plantas de fresa a ambos tipos de estreses y se estudiaron los cambios transcriptómicos que ocurrían en el fruto (Galli *et al.*,

2019). Tanto el rendimiento de la planta como su biomasa se redujeron cuando fueron sometidas a estrés salino, y aún más en plantas con estrés hídrico. Además, una batería de genes que responden a estos tratamientos y que presentan un alto interés biotecnológico también modificaron su expresión (Galli *et al.*, 2019). La respuesta más común a la sequía en las plantas es el cierre de los estomas de las hojas para minimiza la pérdida de agua por evaporación. Plantas sobreexpresando *RdreBIBI* presentan una disminución en el número de los estomas y una reducción de su apertura, lo que supone una ventaja en condiciones de sequía (Gu *et al.*, 2017). Por otro lado, esta sobreexpresión fue acompañada por una inducción de diversas acuaporinas, lo que también produce una menor pérdida de agua en condiciones de estrés térmico.

La osmotina es una proteína relacionada con la patogénesis que inicialmente fue identificada en cultivos celulares de tabaco en condiciones de estrés salino. Se ha demostrado que la expresión de este tipo de proteínas se induce tanto en condiciones de estrés abiótico como por infecciones microbianas. En fresa, se ha identificado el gen *OLP2* (*osmotin like protein*) que posee un patrón de expresión ubicuo en la planta (Zhang y Shih, 2007). Este gen responde a diferentes estímulos abióticos (ABA, ácido salicílico y heridas mecánicas) lo que sugiere que podría ayudar a proteger a la planta frente a estos estreses. La sobreexpresión ectópica de una osmotina de tabaco en fresa aumentó la resistencia al estrés salino, lo que apoya la teoría de que estas proteínas juegan un papel importante en la respuesta dicho estrés (Husaini y Abdin, 2008). Del mismo modo, el gen de fresa de transferencia no específica de lípidos (*F×altp*) también es inducido por ABA, ácido salicílico y heridas mecánicas, aunque es reprimido por el estrés al frío (Yubero-Serrano *et al.*, 2003).

A su vez, se han identificado transportadores específicos de sodio y de potasio, tanto en la variedad cultivada como en la ancestral *F. chiloensis*. Plantas de *F. chiloensis* sometidas a estrés salino mostraron una rápida expresión del transportador *FaAKT1* de  $K^+$  mientras que no hubo cambios en el transportador de  $Na^+$  (Garriga *et al.*, 2017). Esta diferencia de expresión puede deberse a la necesidad de mantener un balance entre la concentración de sodio y potasio cuando el sodio extracelular aumenta en condiciones de salinidad.

La sequía, así como otros estreses ambientales suelen estar acompañados por daño oxidativo dentro de las células. Como se ha descrito anteriormente, la respuesta de la planta ante ciertos estreses es acompañada por el aumento en la biosíntesis de compuestos antioxidantes como los flavonoles. Además, la planta también responde protegiéndose del estrés mediante la síntesis de enzimas protectoras, como la metionina sulfóxido reductasa (PMSR). Esta proteína, cuya expresión es específica de receptáculos rojos, expresada en *E. coli* redujo el sulfóxido de metionina libre a metionina, lo que protegía a las bacterias frente al daño producido por la adición

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (López *et al.*, 2006). Por otro lado, plantas transgénicas sobreexpresando *RdreB1BI* presentaron una mayor expresión de enzimas antioxidantes como POD (peroxidasa) y SOD (superóxido dismutasa) (Gu *et al.*, 2017). La sobreexpresión del factor de transcripción de tipo WRKY de *F. vesca* *FvWRKY42* en *Arabidopsis* mejoró sustancialmente la tasa de germinación en presencia de altas concentraciones de sodio y afectó al tamaño de las raíces haciéndolas más resistentes a la sequía (Wei *et al.*, 2018b). Además, estas plantas presentaron una mayor concentración de las enzimas SOD y CAT (Wei *et al.*, 2018b). De nuevo, esta respuesta también estuvo acompañada de un incremento del cierre de los estomas mediado por la mayor sensibilidad de estas plantas al ABA. 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).

También, ha sido identificada y caracterizada en fresa una peroxidasa (FaPRX27) (Ring *et al.*, 2013). Las peroxidases catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al tomar electrones de varias moléculas donadoras. En plantas, las peroxidases de clase III oxidan moléculas donadoras de electrones como fenoles, precursores de ligninas y otros metabolitos secundarios, como los flavonoides. Ensayos enzimáticos han confirmado el papel desempeñado por FaPRX27 en la biosíntesis de lignina a partir de ácido felúrico, coniferil alcohol y ácido cafeico que son transformados en dihidrodímeros en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, análisis de QTL mostraron que el gen *FaPRX27* está vinculado a una región implicada en la disminución del color de la fruta. Esta aproximación experimental es funcionalmente relevante y confirma a FaPRX27 como una peroxidasa que interviene en la polimerización de compuestos fenólicos solubles en planta durante la síntesis de lignina. Por consiguiente, FaPRX27 competiría con las enzimas de la ruta de biosíntesis de flavonoides y antocianinas por los sustratos y determinaría la intensidad del color de la fruta roja (Ring *et al.*, 2013).

### **10.1.2. Resistencia a agentes bióticos**

Los cultivos de fresa son susceptibles a diversas enfermedades y plagas responsables de importantes pérdidas económicas, tanto por el gasto económico que suponen los tratamientos fitosanitarios para combatirlas como por la reducción que suponen en la producción. La prohibición del uso de diversos fitoquímicos, como el bromuro de metilo, 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 de la planta de fresa mediante su manipulación genética.

La antracnosis es una de las principales enfermedades fúngicas que afecta a los cultivos de fresa. Es causada por tres especies de *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. fragariae* y *C.*



*gloeosporioides*). Sus infecciones se caracterizan por dañar los órganos vegetativos de la planta y el fruto disminuyendo en gran medida el rendimiento económico del cultivo. Esta infección es especialmente dañina en los campos de Huelva debido a las condiciones de temperatura y humedad. El crecimiento de *Colletotrichum* es especialmente favorable entre los 24 y 28°C, con episodios de humedad y, además, las esporas del hongo son fácilmente dispersadas por el riego, la lluvia, el rocío, insectos y por los trabajadores agrícolas (Smith, 1990; Mertely *et al.*, 2017). Aun así, se han podido seleccionar variedades resistentes de fresa mediante programas clásicos de mejora de cultivos (Smith *et al.*, 1996).

La antracnosis es un campo de investigación muy activo. Se han logrado identificar el papel de diferentes genes que confieren resistencia a esta infección. Estudios realizados con poblaciones segregantes de *F. ananassa* mostraron que la resistencia a estos hongos puede ser tanto poligénica como mendeliana (Giménez y Ballington, 2002; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005). Otro estudio de asociación del genoma (GWAS, *Genome Wide Association Studies*), usando variedades con diferentes niveles de sensibilidad al hongo, reportaron una región localizada en el cromosoma 6 asociada con una menor incidencia de la antracnosis, concretamente la causada por el hongo *C. acutatum*, denominado *FaRCa1* (Salinas *et al.*, 2018). Un estudio similar, pero realizado con infecciones de *C. gloeosporoides*, descubrió otra región en el cromosoma 6 asociada con mayor resistencia a la antracnosis causada por este hongo (Anciro *et al.*, 2018). Esta región, denominada *FaRCg1*, se encuentra a solo 10 centimorgan de *FaRCa1* lo que sugiere que los genes que determinan una mayor resistencia a la antracnosis se encuentran en el cromosoma 6 de *F. Vesca*. Esta información delimita y estrecha la búsqueda de genes que puedan ser usados para programas de mejora genética.

Para identificar que genes responden ante la infección por *Colletotrichum*, diferentes cultivares fueron sometidos a infecciones de *C. gloeosporoides*. Los estudios transcriptómicos comparativos entre el cultivar más resistente (cv. Yanli) y el más susceptible (cv. Benihoppe) arrojaron un total de 226 genes sobreexpresados a causa de la infección en ambos genes (Wang *et al.*, 2017). Tres categorías fueron las que mostraron mayor número de genes sobreexpresados: la respuesta innata mediada por proteínas PRR; los receptores de tipo R, necesarios para que la planta reconozca al atacante; y los factores de transcripción de tipo WRKY, que también responden en gran medida al ataque por patógenos. Dentro de esta familia, se ha identificado el papel que juega *FaWRKY1* en la respuesta al ataque por patógenos. Este FT responde positivamente al ataque por *C. acutatum* y revierte el genotipo *knock-down* de *AtWRKY75*, un FT responsable de la defensa en *A. thaliana* (Encinas-Villarejo *et al.*, 2009). En frutos, el silenciamiento transitorio mediante ARNi de *FaWRKY1* aumentó la resistencia de estos a la infección por *C. acutatum*. Sin embargo, la sobreexpresión de este gen no produjo ninguna

diferencia en la resistencia tras 5 días de infección. Estos estudios demuestran el papel como regulador negativo de *FaWRKY1* en la respuesta a *C. acutatum* (Higuera *et al.*, 2019).

Otro de los métodos de respuesta de las plantas son la secreción de pequeños polipéptidos, denominados factores de alcalinización rápida (RALF, *Rapid Alkalinization Factor*), que son capaces de incrementar el pH extracelular. Dentro de las proteínas tipo RALF identificadas en fresa, *FaRALF33* presenta una rápida respuesta tras la infección con *C. acutatum*, o *B. cinerea*. El silenciamiento de *FaRALF33* en frutos de fresa retrasa la colonización del hongo sin embargo, la sobreexpresión disminuye la resistencia del fruto al hongo y permite su dispersión a lo largo del fruto, lo que demuestra que *FaRALF33* juega un papel fundamental en la resistencia a *C. acutatum* (Merino *et al.*, 2019).

Otro hongo patógeno con capacidad de infectar a la fresa es *Verticillium dahliae*. Este hongo accede a la planta desde el suelo atacando a los tejidos vasculares y causando graves pérdidas. La sensibilidad a este hongo varía en diferentes cultivares, identificando a cv. Redgauntlet como la más resistente y a cv. Hapil como la más susceptible. El cruce entre ambas variedades y el estudio de QTLs asociado demostró que 11 loci pueden tener relación con la resistencia al hongo (Antanaviciute *et al.*, 2015). No obstante, son necesarios más estudios sobre estos loci para tratar de identificar genes candidatos a mejorar la resistencia de la planta al hongo. Otro estudio similar de QTLs ha identificado como potenciales genes relacionados con la resistencia a *Verticillium* a genes de tipo NBS (*nucleotide binding sites*). Estos genes están relacionados con las proteínas ricas en leucina (LRR) que son importantes en la primera barrera de defensa de la planta frente al hongo (Cockerton *et al.*, 2019). Las proteínas de la familia PR (*pathogenesis related*) también están relacionadas con la respuesta a diferentes tipos de estreses. En concreto, las de tipo PR10 están relacionadas con la respuesta a *Verticillium*. En fresa, la inoculación de plantas con este hongo activó la transcripción de varios genes de esta familia, con especificidad de expresión en la raíz, como PR10.02, .06, .08, o en las hojas PR10.03, .11 o .16 (Besbes *et al.*, 2019).

Otros estudios realizados con plantas transgénicas de fresa han mostrado que altos niveles de quitinasa reducen los daños causados por el hongo oidio (Asao *et al.*, 1997; Asao *et al.*, 2003). En este sentido, se ha aislado un gen codificante para una quitinasa (*pcht28*) procedente de *Solanum chilensis* que, al ser transferido a plantas de fresa del cv. Joliette, incrementa significativamente la resistencia de las plantas transgénicas a *V. dahliae* (Chalavi *et al.*, 2003). Paralelamente, se obtuvieron líneas transgénicas de fresas expresando independientemente tres genes de defensa: *ch5B*, codificante de una proteína quitinasa de judía (*Phaseolus vulgaris*), *gln2* que codifica una glucanasa de tabaco, y *ap34* que codifica una taumatina de tabaco. En este

estudio se indica que la expresión del gen *ch5B* en frutos de fresa transgénicos mejoró la resistencia de éstos al moho gris aunque no tuvo ningún efecto significativo en su resistencia a la antracnosis (Ricardo *et al.*, 2006).

*Botrytis cinerea*, hongo causante del moho gris, causa una enfermedad muy común en las regiones productoras de fresa y una de las más destructivas. La infección aparece en primer lugar en flores aunque son los pétalos y los estambres los primeros órganos que se infectan. El receptáculo se infecta a partir del hongo que crece internamente desde los estambres, aunque la infección a través de los pétalos también es posible. Aún no se han identificado cultivares de *F. ananassa* resistentes a *B. cinerea* aunque se ha observado diferente grado de susceptibilidad en varios cultivares, probablemente debido a las características morfológicas de cada uno de ellas. Ya que la infección por este hongo es latente en las flores y ataca posteriormente a los frutos, se han estudiado los transcriptomas de frutos de la especie silvestre *F. vesca* en diferentes estados de maduración y de flores infectadas con el hongo para conocer qué genes responden al patógeno. Un total de 987 genes respondieron a la infección en estadio rojo, de los cuales 649 se sobreexpresaron. De estos genes destacan aquellos relacionados con la traducción de señales, como proteínas de membrana y receptores, proteínas que modifican la pared celular, como *FaRGLyase1*, o genes relacionados con la modulación de la respuesta hormonal (Mehari-Haile *et al.*, 2019). También, se han obtenido resultados positivos en plantas de fresa del cv. Pegasus transformadas con la proteína PGIP inhibidora de la poligalacturonasa de pera. Estas plantas fueron más resistentes a la infección por *B. cinerea* tras rociar cada flor con una suspensión de conidios del hongo (Schaart *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión ectópica del gen *FaPME1* confiere resistencia frente al ataque de este hongo patógeno ya que aumenta la producción de oligogalacturonoides demetilados que refuerzan el sistema de defensa de la planta (Osorio *et al.*, 2011).

La resistencia contra enfermedades bacterianas y plagas de artrópodos ha sido menos estudiada. No obstante, se han identificado mecanismos de resistencia contra *Xanthomonas fragariae* en *F. virginiana*, *F. chiloensis*, *F. ananassa* y otros genotipos octoploides de *Fragaria* (Maas *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2006). Por otra parte, también se han estudiado poblaciones segregantes de *F. chiloensis* cruzadas con *F. ananassa* con el objetivo de identificar genes relacionados con la resistencia a pulgones y ácaros (Barritt y Shanks, 1980; 1981).

Todos estos trabajos abren la puerta a la mejora genética de la planta de fresa debido a la obtención de resultados prometedores en la resistencia frente a diferentes tipos de 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, lo que impide su uso y explotación económica.

Por tanto, y mientras llega esta regulación, se están llevando a cabo análisis de algunos péptidos y productos naturales con propiedades antibióticas aislados a partir de la planta de fresa. En este sentido, se ha evaluado la actividad antifúngica de ciertos compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por la planta de fresa frente a la infección por *C. acutatum*, lo que abre nuevas perspectivas en el control biológico de patógenos. Se ha observado también 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, a partir de hojas de fresa, se ha aislado una molécula pequeña de 316 Da con actividad antibiótica denominada Fragarina que parece participar en respuesta a procesos de estrés (Filippone *et al.*, 1999).

## 10.2. Mejora de la floración y fructificación de la planta de fresa

La mejora de la floración y la fructificación es un objetivo a conseguir, no solo para el cultivo de fresa, sino para cualquier cultivo de interés agronómico. El incremento de la población mundial aumenta la necesidad de incrementar la producción vegetal para poder asegurar alimento a toda la humanidad. La floración y fructificación implican múltiples mecanismos que resultan en diferentes respuestas en función del fotoperíodo y la temperatura (Rantanen *et al.*, 2014; 2015). Se ha descrito un factor de transcripción de tipo MADS-box, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS 1 (FaSOC1)*, como inductor de la floración en fresa (Lei *et al.*, 2013). La sobreexpresión de este gen en *A. thaliana* incrementa la expresión de los genes relacionados con el control de la floración como *LEAFY (LFY)* y *APETALA 1 (API)* (Lei *et al.*, 2013). En *F. vesca*, la sobreexpresión de *FvSOC1* reprime el inicio de la floración en condiciones de día corto mientras que su silenciamiento causa floración continua sin importar la duración del día, lo que es similar al fenotipo obtenido en las plantas transgénicas con el represor floral *terminal flower 1 (FvTFL1)* silenciado (Mouhu *et al.*, 2013). El análisis molecular de estas plantas transgénicas reveló que *FvSOC1* activa la expresión de *FvTFL1* en el meristemo floral conduciendo a la represión de la floración (Mouhu *et al.*, 2013). A su vez, *FvSOC1* está regulado por el fotoperíodo y por *flowering locus T1 (FvFLT1)* (Mouhu *et al.*, 2013). Por otro lado, el silenciamiento de *FvTFL1* produjo plantas de fresa con floración permanente (Koskela *et al.*, 2012).

Mientras que la ruta de inhibición de la floración ha sido ampliamente estudiada en *F. vesca*, los factores implicados en su inducción aún son inciertos. Por el momento, en *F. ananassa* se ha identificado el locus *FaPFRU*. Dentro de este locus se encuentra *FaFT1 (FLOWERING LOCUS T)* como un posible promotor floral (Nakano *et al.*, 2015). La unión de *FaFT1* o de *FaFLT1* al factor de transcripción *FD* será lo que decida la identidad del meristemo y determinará así la reproducción sexual o asexual de la planta. (Wickland and Hanzawa, 2015).

La modificación de la época del año en el que la planta puede florecer y fructificar mejoraría su producción de manera cuantitativa y cualitativa. Para ello, 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, tanto de su capacidad de adaptación como de la resistencia a las enfermedades. Estas modificaciones pueden lograrse fácilmente mediante la introducción de genes capaces de alterar la regulación endógena del crecimiento vegetal (PGRs). Las auxinas son la hormona principal que coordina el crecimiento y desarrollo de los frutos inmaduros. Recientemente, ha sido demostrado que dos genes YUCCA están implicados en la floración y desarrollo de la fresa. La sobreexpresión de *FvYUC6* produjo plantas con alto contenido en auxinas, retraso en la floración y esterilidad masculina completa en *F. vesca* (Liu *et al.*, 2014); mientras que el silenciamiento inhibió significativamente el crecimiento vegetativo, el desarrollo floral y los frutos se vieron ampliamente afectados. Además, se detectó una clara correlación entre el silenciamiento de *FvYUC6*, la expresión de un grupo de genes de respuesta a auxinas y los niveles de IAA libre en dichas plantas transgénicas (Liu *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha determinado que el nivel de expresión de la enzima GA20ox está relacionado que el destino final del meristemo y su diferenciación a flor o estolón y, por lo tanto, con el contenido de giberelinas en el meristemo (Teneira *et al.*, 2017).

### **10.3. Mejora de la calidad del fruto de fresa mediante la modificación de sus propiedades organolépticas**

Otra de las prioridades actuales en los programas de mejora genética entre las bayas es la mejora de la calidad de la fruta. La mejora del sabor, esto es, la combinación de la acidez, dulzor, y aroma, así como de la firmeza es el objetivo principal de los programas de biotecnología. Estos caracteres están controlados por una gran cantidad de genes en procesos asociados al desarrollo y maduración de la fruta (Manning, 1994).

#### **10.3.1. Manipulación del proceso de reblandecimiento**

Desde el punto de vista del consumidor, la dureza es la principal característica a tener en cuenta para la elección del fruto. El reblandecimiento es un proceso asociado a la maduración y se debe a la solubilización y despolimerización de la pared celular en un proceso ordenado llevado a cabo por diversas enzimas. Así, mediante el silenciamiento de la expresión de genes involucrados en la degradación de la pared celular, se está intentando retrasar el reblandecimiento del fruto (Mathews *et al.*, 1995; Woolley *et al.*, 2001; Jimenez-Bermúdez *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2006; Sesmero *et al.*, 2007; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Posé *et al.*, 2013). Las expansinas son un grupo de enzimas que favorecen la extensión de la pared celular. Se ha propuesto que estas proteínas degradan puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa *in*

*vivo* lo que resulta en 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). La función de estas enzimas explica la alta expresión de los genes que las codifican en tejidos vegetales que presentan una pared celular en crecimiento como hipocotilos (McQueen-Mason *et al.*, 1992), 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). En tomate, se ha comprobado que la expresión de varias expansinas está relacionada con la hidrólisis de polímeros de pared celular y con el reblandecimiento del fruto (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Civello *et al.*, 1999; Brummell y Harpster, 2001; Li *et al.*, 2003). Igualmente, en fresa se han identificado siete expansinas diferentes en el genoma de las cuales *FaExp2* es la única que presenta un marcado perfil relacionado con la maduración. Esta enzima presenta una elevada homología de secuencia con una expansina expresada en el desarrollo temprano del tomate (Civello *et al.*, 1999). Por otra parte, también se ha relacionado la expresión de expansinas con la dureza del fruto ya que variedades de fresa más blandas presentan mayor expresión de estos genes al inicio de la maduración (Dotto *et al.*, 2006).

Por otro lado, se han identificado en fresa dos celulasas, también llamadas EGasas, (*FaCell1* y *FaCel2*) (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). Mientras que *FaCel2* presenta un perfil no específico del receptáculo, *FaCell1* se expresa principalmente en el proceso de maduración (Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999). Por lo tanto, *FaCell1* puede estar implicado en los procesos de degradación y reblandecimiento de la pared celular mientras que *Facel2* se relaciona con las modificaciones necesarias para facilitar el crecimiento celular y la expansión (Woolley *et al.*, 2001). El estudio de las estructuras secundarias de ambas proteínas ha determinado que existen diferencias entre ambas proteínas (Llop-Tous *et al.*, 1999). El dominio celulosa que se presenta en la estructura *Facel2* indica que esta enzima puede estar activa en los xiloglucanos presentes en la celulosa de la pared celular (Trainotti *et al.*, 1999). La acción de *Facel2* hidrolizaría la red de xiloglucanos en los primeros estadios del desarrollo haciéndola más susceptible a la actividad de *Facel1* (Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001). El silenciamiento de *FaCell1* combinado con el de *FaCel2* resultó en frutos que presentan menor actividad celulasa y cambios en la dureza del fruto (Woolley *et al.*, 2001; Palomer *et al.*, 2006). Esto sugiere que estas enzimas no son las únicas con actividad celulasa en el proceso de maduración (Palomer *et al.*, 2006).

Se han aislado y caracterizado en fresa varias poligalacturonasas (PG1, PG2 y PG3) (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 mayor

expresión y actividad en cultivares con frutos más blandos (Salentijn *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2015). La obtención de plantas transgénicas con la expresión de *FaPG1* silenciada produjo frutos más firmes y una disminución del reblandecimiento en la postcosecha (Quesada *et al.*, 2009; Posé *et al.*, 2013). El silenciamiento de este gen redujo la solubilización y despolimerización de las pectinas de la pared, otorgándole mayor integridad y firmeza (García-Gago *et al.*, 2009). Mas recientemente se han obtenido plantas transgénicas con el silenciamiento de *FaPG2* y un doble silenciamiento *FaPG1-FaPG2*. Así, mientras que las plantas transgénicas con *FaPG2* silenciada presentaron un aumento de la dureza del fruto, similar al fenotipo de las plantas ARNi-*FaPG1*, el doble silenciamiento de *FaPG1-FaPG2* no mostró un efecto sinérgico y los frutos transgénicos obtenidos mostraron un nivel de dureza similar al obtenido tras el silenciamiento independiente de *FaPG1* o *FaPG2* (Paniagua *et al.*, 2020).

Por otro lado, otras de las enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular más estudiadas en fresa son las pectato liasas. Estas enzimas presentan un aumento de su expresión a lo largo del proceso de maduración del fruto. Además, presentan una localización asociada a la pared celular lo que indica que tienen una función importante en el proceso de despolimerización de la pared celular (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Benítez-Burraco *et al.*, 2002). Para obtener más información sobre estas enzimas, se analizaron plantas transgénicas con el gen *FaplC* silenciadas. Los frutos transgénicos obtenidos mostraron un aumento de la firmeza y menor reblandecimiento postcosecha sin presentar diferencias en el color, tamaño o peso (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Además, plantas transgénicas con una reducción casi completa del nivel del transcrito de las PL mostraron diferencias en los polímeros de la pectina de la pared y un claro incremento del grado de firmeza de los frutos transgénicos obtenidos (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). Estos resultados indican que las PL juegan un papel primordial en la degradación de la pared primaria y de la lámina media durante la maduración.

Otro gen implicado en la degradación de la pared son las ramnogalacuronato liasas. El silenciamiento transitorio en fresa mantuvo íntegra la lámina media de los frutos maduros en comparación con los frutos control. Además, se mantuvo intacta la estructura de la pared celular y el área de contacto entre las células. Esto demuestra que *FaRGlyase1* juega un papel crítico en el reblandecimiento del fruto mediante la degradación de la lámina media (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013). Se hipotetiza que la acción de las pectín metil esterases es un requisito previo para que las enzimas hidrolíticas como PG y PL puedan acceder a sus sustratos (Prasanna *et al.*, 2007). Se ha comprobado que *FaPME1* presenta un incremento de expresión en el proceso de maduración similar al de PL y PGs lo que sugiere que las actividades de estas enzimas están coordinadas para producir la degradación de la pared. De hecho, este proceso es ordenado y en él participan las enzimas de forma sucesiva dejando libre el sustrato para la acción de la siguiente. Los estudios

llevados a cabo con estas enzimas y con las descritas en el apartado 5 de esta introducción las hacen muy atractivas como dianas biotecnológicas para la mejora del reblandecimiento del fruto, tanto retrasando como regulando este proceso antes y después de su cosecha.

### 10.3.2. Mejora de las propiedades organolépticas

El sabor del fruto es una de las principales características que hacen de la fresa una de las frutas más deseadas entre los consumidores. En la última década, la mejora de sus propiedades organolépticas ha centrado la atención de diferentes investigaciones, en gran medida debido al aumento de la demanda del consumidor. El dulzor de la fruta, debido a la concentración de azúcares, juega un papel importante en la determinación del sabor y la calidad. La concentración de azúcares influye indudablemente en el potencial osmótico de las células, lo cual genera un desajuste en la importación de agua y, por lo tanto, en el crecimiento del fruto. La invertasa es la enzima responsable de catalizar la sacarosa en sus monómeros, glucosa y fructosa. El intercambio de sacarosa entre el floema y el interior celular está regulado por una invertasa localizada en la pared celular que regula la salida de la sacarosa al floema, mientras que otra localizada en la vacuola regula el almacenamiento (Xie *et al.*, 2007). La introducción de las invertasas vacuolar y de pared de patata en fresa otorgó diferencias en el crecimiento de la planta, así como en la composición de azúcares y, por lo tanto, en el sabor y calidad del fruto (Graham *et al.*, 1997).

El estudio de una quinasa con dominios serina/treonina (*FaSnRK1*) ha mostrado su papel regulador de genes relacionados con la acumulación de azúcares. Estas proteínas están relacionadas con las modificaciones postranscripcionales de enzimas directamente relacionadas con la síntesis de sacarosa, como sacarosa-fosfotransferasa (SPS) y sacarosa sintasa (SUS) (Harthtill *et al.*, 2006). La sobreexpresión de esta quinasa incrementó los niveles de sacarosa en el fruto mientras que su silenciamiento los redujo (Luo *et al.*, 2020). Estudios posteriores demostraron que *FaSnRK1* promueve el transporte de glucosa e inhibe su conversión regulando la expresión de genes y la actividad de enzimas clave en la síntesis de sacarosa como son SPS y SUS (Luo *et al.*, 2020). Por otro lado, la sobreexpresión del *miRNA399* incrementó la concentración de azúcares, de ácidos y de vitamina C, mejorando así el sabor de la fruta. Este miRNA, relacionado con el metabolismo del fósforo, parece mejorar la tasa fotosintética y puede mejorar la acumulación de estos metabolitos (Wang *et al.*, 2017).

El silenciamiento de la pirofosforilasa ADP-glucosa (AGPasa) también modificó el contenido de azúcares y de almidón en el fruto (Park *et al.*, 2006). Este gen es especialmente interesante porque se consiguió aumentar el contenido de azúcares y disminuir el de almidón sin alterar otras características organolépticas clave del fruto. La identificación de estos genes sienta



una base con la identificación de diversas dianas biotecnológicas con las que mejorar el contenido de azúcares, y por lo tanto el sabor de la fruta.

Además del contenido en azúcares, el interés por mejorar otros aspectos organolépticos del fruto ha llevado a incrementar los esfuerzos biotecnológicos dirigidos en este sentido. Muchos de ellos usan estrategias genómicas para identificar genes que estén relacionados con el control del sabor de la fruta. Posteriormente, se buscan marcadores moleculares asociados a estos caracteres organolépticos para poder seguir estos genes en diferentes poblaciones y así, identificar más fácilmente variedades con mejoras en el sabor o en el olor. Como ejemplo, asociado con la  $\gamma$ -decalactona, un volátil que otorga un ligero sabor a melocotón se ha identificado a una desaturasa de ácidos grasos, *FaFAD1*. Este gen está presente en variedades donde se ha identificado la  $\gamma$ -decalactona y ausente en aquellos que no la producen. (Chambers *et al.*, 2014). De igual manera, se asocia la presencia de una metil transferasa (*FaOMT*) asociada al nivel de mesilfurano, un compuesto volátil que otorga notas de olor a cereza, que aparece en variedades que presentan esta enzima (Cruz-Rus *et al.*, 2017). De hecho, estos genes se usan como marcadores para poder identificar variedades que produzcan ambos compuestos y sirven de método de selección de estas (Cruz-Rus *et al.*, 2017).

El color de la fresa viene determinado principalmente por la síntesis de antocianinas y flavonoides. La síntesis de estos compuestos presenta dos fases durante el desarrollo y maduración del fruto. En los primeros estadios del desarrollo se acumulan las proantocianidinas, asociadas a la defensa del fruto frente a patógenos y herbívoros. Por otro lado, en los receptáculos maduros se acumulan las antocianinas, que producen el color rojo que atrae a los herbívoros para dispersar las semillas. El silenciamiento de una de las ramas de síntesis de proantocianidinas, como es la sintetizada por la antocianidina reductasa (ANR), ha conseguido disminuir la proporción de unidades de epicatequinas y producir un acortamiento en la longitud de las proantocianidinas. Este silenciamiento consiguió redirigir la ruta de las proantocianidinas hacia la síntesis de antocianinas mediante glucosilaciones, consiguiendo una mayor síntesis de flavonoles (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.

Las herramientas biotecnológicas se sólo se usan para la mejora del cultivo, sino también para el estudio del uso de compuestos o microorganismos que mejoren la composición que otorga los valores organolépticos al fruto. Por ejemplo, la co-inoculación de plantas de fresa con una mezcla de hongos micorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal incrementó el número de flores de la planta y por lo tanto la cantidad de frutos, así como la cantidad de azúcares,

ácido fólico y ascórbico, las dos vitaminas con mayor producción en fresa (Bona *et al.*, 2015). En otro estudio, se han encontrado diferentes combinaciones de hongos y bacterias que mejoran propiedades tan diferentes como la concentración de azúcares o de ácidos orgánicos (Todeschini *et al.*, 2017).. Así, parece relacionarse a los hongos con la parte vegetativa de la planta mientras que las bacterias parecen tener mayor relación con las propiedades relacionadas con los frutos, tanto en la composición de compuestos químicos como en el rendimiento de la planta (Todeschini *et al.*, 2017). Estos resultados parecen indicar que la interacción microorganismos y la planta afecta positivamente a la calidad del fruto y puede ser una estrategia para aprovechar en la agricultura sostenible. Al igual que con la mejora del sabor, la interacción entre la planta de fresa con ciertas especies de *Pseudomonas* y reduciendo la fertilización del suelo, se ha conseguido aumentar la concentración de antocianinas, como son pelargonidina-3-glucosido y cianidina 3-glucosido, abriendo la puerta a un cultivo de fresa donde se use una menor cantidad de fertilizantes sin perder las cualidades organolépticas del fruto (Lingua *et al.*, 2013).

## 11. Alérgenos de la fresa

Las alergias alimentarias están incrementándose en los últimos años, principalmente debido a los componentes proteicos de los alimentos (Mills *et al.*, 2003). Estas alergias son producidas por un pequeño número de proteínas homólogas entre ellas cuyo principal representante es Bet v1 de abedul. En fresa, al igual que en otros frutos, también aparecen proteínas que producen reacciones alérgicas. En este caso, es la familia Fra a1 la que presenta mayor homología a Bet v1 (Muñoz *et al.*, 2010). Estas proteínas son capaces de unirse a inmunoglobulinas E y desarrollar la respuesta inmune (Karlsson *et al.*, 2004; Musidlowska-Persson *et al.*, 2007).

Hasta 8 proteínas Fra a1 se han identificado en fresa pertenecientes a diferentes familias, desde proteínas PR de repuesta a patógenos a proteínas transportadoras de lípidos (Zuidmeer *et al.*, 2006). En la búsqueda de variedades con menor contenido de alérgenos, se han realizado estudios proteómicos en los que se han comparado variedades blancas con variedades rojas. El contenido de alérgenos fue menor en las variedades blancas que en las rojas, lo que relaciona el contenido de estos compuestos con la síntesis de antocianinas (Hjernø *et al.*, 2006; Alm *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2010; Seutter von Loetzen *et al.*, 2012; Franz-Oberdorf *et al.*, 2017). Se cree que las proteínas Fra a pueden formar complejos multiproteicos con enzimas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides, como PAL, CHS y C4H, lo que podría explicar su ausencia en genotipos blancos. Fra a también puede estar implicado en el transporte de los flavonoides a través de la célula y jugar un papel regulador en la señalización intracelular debido a su capacidad de unión específica a estos compuestos (Casañal *et al.*, 2013).

Otros alérgenos presentes en la 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 mostró una menor alergenicidad de estas proteínas que sus homólogos de manzana o melocotón, por lo que pueden ser empleadas en tratamientos de inmunoterapia (Zuidmeer *et al.*, 2006).

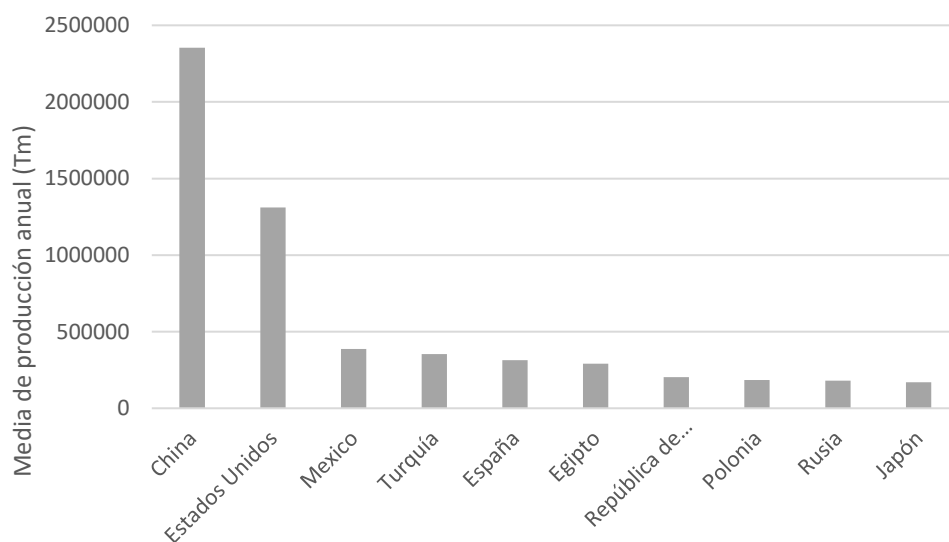
## 12. Importancia económica del fruto de fresa

La fresa es una de las frutas más consumidas y forma parte de la dieta de millones de personas. Su cultivo se extiende a diversas regiones del mundo, desde los polos hasta los trópicos, aunque se concentra mayoritariamente en el hemisferio norte. No existen barreras genéticas ni climáticas al cultivo. En los últimos años, el cultivo de fresa ha aumentado año tras año. Tomando como referencia los 10 últimos años con datos disponibles (2008-2018, FAO 2018), España es el quinto productor del mundo y primer productor de Europa, con una media de 310 toneladas anuales, aproximadamente el 30% del total del continente (Figura 17, FAO 2018). La República Popular de China es el primer productor de fresa en el mundo, con 235 millones de toneladas, aproximadamente el 25% del total, seguida por Estados Unidos, México, Turquía y España (Figura 17).

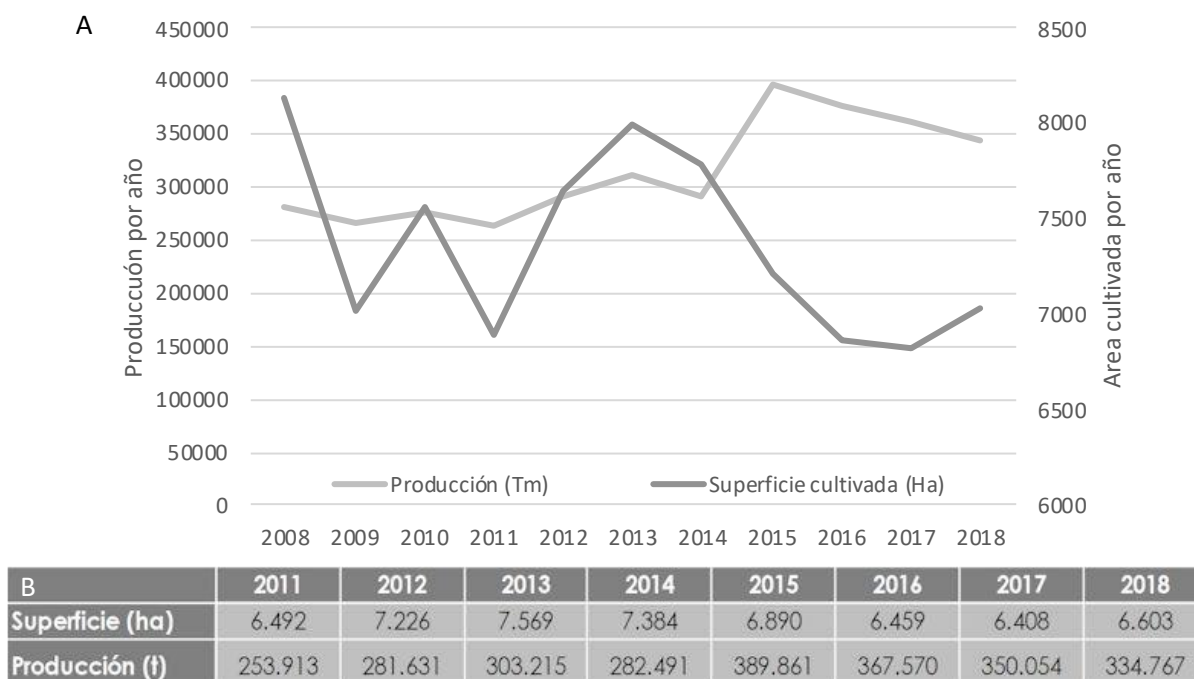
En España, mientras la producción ha aumentado en los últimos años, de unas 200 mil toneladas en la década de los 90 a 400 mil en los tres últimos años, la superficie cultivada se ha visto reducida debido a una mejora en el rendimiento del cultivo (FAO, 2018, Figura 18A). Dentro de la producción española, la provincia de Huelva concentra el 90-95% de la producción total (Figura 18B, Anuario CAPDR, 2018). De toda la producción, más del 80% de ésta se exporta, siendo Alemania su principal destino. El valor de las exportaciones asciende a más de 400 millones de euros por lo que el cultivo de la fresa es uno de los principales motores económicos de Andalucía. Sin embargo, una gran parte de la producción (5-25%) se pierde debido al reblandecimiento a lo largo de la maduración, por el transporte o a la infección por patógenos (López-Aranda, 1997).

Tal y como se ha visto en esta introducción, la investigación en la mejora biotecnológica de este cultivo es un campo activo en la investigación. Aun así, su aplicación es muy limitada debido al coste económico de los programas de desarrollo. Además, la legislación europea aún prohíbe el cultivo y comercialización de plantas transgénicas, lo cual hace poco llamativo este tipo de estudios al público en general. Dentro de todos los frutos, la fresa es especialmente

interesante para la mejora mediante biotecnología avanzada debido a su alta producción (Mezzetti, 2003). Actualmente, la transformación de la fresa sigue siendo un proceso lento y costoso, que puede necesitar de meses para la obtención de brotes e incluso años para el cultivo de la planta, además de presentar una baja eficiencia (Liu y Sanford, 1988; Nehra *et al.*, 1990; Barceló *et al.*, 1998; Passey *et al.*, 2003). No obstante, la mejora genética de la fresa sigue siendo un gran atractivo y se considera un modelo interesante para el desarrollo de la genómica y de estudios de ADN recombinante entre las diferentes especies de *Rosaceas*. Esta mejora genética puede estar motivada por el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 que permite la edición génica sin necesidad de insertar moléculas foráneas en el genoma de la planta (Jinek *et al.*, 2012). A pesar de ser una tecnología relativamente novedosa, ya se han demostrado las primeras aplicaciones en fresa, tanto en las especies diploides (*F. vesca*,) como en las octoploides (*F. ananassa*) (Martín-Pizarro *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Los resultados en la especie octoploide son especialmente alentadores ya que, a pesar de que teóricamente pueden presentar mayor dificultad de editado, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la edición mediada por CRISPR/Cas9 es un sistema que puede usarse en la mejora de *F. ananassa*.



**Figura 17.** Principales países productores de fresa en el periodo 2008-2018 (FAO, 2018).



**Figura 18.** A) Producción de fresa y área cultivada en España en el periodo 2008-2018 (FAO, 2018)  
 B) Producción y área cultivada en la provincia de Huelva en el periodo 2011-2018. (CAPDR, 2018).

## Bibliografía

- 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, Bertea 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 non-climacteric fruit. *Plant Physiology* **129**: 1019-1031.
- Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe 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.

**Alvarez-Suarez A, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González Paramás AM, Santos-Buelga C, Busco F, Quiles JL, Cordero MD, Bompadre S, Mezzetti B, Bettino M.** 2014. One-month strawberry rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress marker and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* **25**: 289-294.

**Amaya I, Osorio S, Martínez-Ferri E, Lima-Silva V, Doblás 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.

**Anciro A, Mangandi J, Verma S, Peres N, Whitaker VM, Lee S.** 2018. *FaRCg1* a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporoides* in octoploid strawberry. *Theoretical and Applied Genetics* **131**: 2167-2177.

**Antanaviciute L, Šurbanovski N, Harrison N, McLeary KJ, Simpsons DW, Wilson F, Sargent DJ, Harrison RJ.** 2015. Mapping QTL associated with *Verticillium dahliae* resistance in the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Horticulture research* **2**: 15009.

**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 × 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.

**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.

**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 AA, Nguyen NM, Lyons TJ.** 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-Nevaldo 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.
- Besbes F, Habegger R, Schwab W.** 2019. Induction of *PR-10* genes and metabolites in strawberry plants in response to *Verticillium dahliae* infection. *BMC Plant Biology* **19**: 128.
- 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.
- Bringhurst 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.
- Bulley S, Wright M, Rommens C, Yan H, Rassam M, Lin-Wang K, Andre C, Brewster D, Karunairetnam S, Allan AC, Laing WA.** 2012. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the l-galactose pathway gene GDP-l-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 390-397.
- Bustamante CA, Rosli HG, Añón MC, Civello PM, Martínez 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 Science* **171**: 497-504.
- Bustamante CA, Civello PM, Martínez GA.** 2009. Cloning of the promoter region of  $\beta$ -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit. *Plant Science* **177**: 49-56.
- 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.
- Chai Y, Zhang Q, Tian L, Li CH, Xing Y, Qin L, Shen YY.** 2013. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regulation* **69**: 63-69.
- 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 AH, Pillet J, Plotto A, Bai J, Whitaker VM, Folta KM.** 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.
- Cheng J, Niu Q, Zhang B, Chen K, Yang R, Zhu JK, Zhang Y, Lang Z.** 2018. Downregulation of RdDM during strawberry fruit ripening. *Genome Biology* **19**: 212.

- 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.
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, Jacobsen SE, Fischer RL.** 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* **110**:33–42.
- Civello PM, Martínez GA, Chaves AR, 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.
- Cockerton HM, Li B, Vickerstaff RJ, Eyre CA, Sargent DJ, Armitage AD, Marina-Montes C, Garcia-Cruz A, Passey AJ, Simpson DW, Jonathan-Harrison R.** 2019 Identifying *Verticillium dahliae* resistance in strawberry through disease screening of multiple populations and image-based phenotyping. *Frontiers in Plant Science*. **10**: 924.
- Cockshull KE, Graves CJ, Cave CRJ.** 1992. The influence of shading on yield of glasshouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science* **67**: 11-24.
- Concha CM, Figueroa NE, Poblete LA, Oñate FA, Schwab W, Figueroa CR.** 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.
- 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 x ananassa* Duch, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis* **28**: 23-30.
- Cruz-Rus E, Sesmero R, Ángel-Pérez JA, Sánchez-Sevilla JF, Ulrich D, Amaya I.** 2017. Validation of a PCR test to predict the presence of flavor volatiles mesifurane and  $\gamma$ -decalactone in fruits of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Molecular Breeding*. **37**: 131.
- 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 signaling 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.
- 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 Experimental Botany* **57**: 2401–2411.
- Dennis FG.** 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, Lerceteanu-Köhler E, Risser G.** 2005. Inheritance of a resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* **95**: 405–412.
- Dotto MC, Martínez GA, Civello PM.** 2006. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology Biochemistry* **44**: 301–307.
- 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 for Human Nutrition* **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 J, Johnson LM, Groth M, Feng S, Hale CJ, Li S, Vashisht AA, Gallego-Bartolomé J, Wohlschlegel JA, Patel DJ, Jacobsen SE.** (2014). Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Molecular Cell* **55**: 495–504.
- 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<sup>+</sup>-dependent sorbitol dehydrogenase and sorbitol-6-phosphate dehydrogenase genes in strawberry. *Journal Horticultural Science Biotechnology* **82**: 191–198.
- Edger PP, VanBuren R, Colle M, Poorten TJ, Wai CM, Niederhuth CE, Alger EI, Ou S, Acharya CB, Wang J, Callow P, McKain MR, Shi J, Collier C, Xiong Z, Mower JP, Slovin JP, Hytönen T, Jiang N, Childs KL, Knapp SJ.** 2017. Single-molecule sequencing and optical mapping yields an improved genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with chromosome-scale contiguity. *GigaScience* gix124.
- Edger PP, Poorten TJ, VanBuren R, Hardigan MA, Colle M, McKain MR, Smith RD, Teresi SJ, Nelson ADL, Wai CM, Alger EI, Bird KA, Yocca AE, Pumphlin N, Ou S, Ben-Zvi G, Brodt A, Baruch K, Swale T, Shiue L, Acharya CB, Cole GS, Mower JP, Childs KL, Jiang N, Lyons E, Freeling M,**

- Puzey JR, Knapp SJ.** 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics* **51**: 541-547.
- El-Kazzaz MK, Sommer NF, Forlage RJ.** 1983. Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. *Phytopathology* **73**: 282-285.
- Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz F, De los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz Blanco J, Caballero JL.** Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria x ananassa*) FaWRKY1 and Arabidopsis AtWRKY71 proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany*. **60**: 3043-3065.
- 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.
- Eshghi S, Tafazoli E.** 2007. Possible role of cytokinins in flower induction in strawberry. *American Journal Plant Physiology* **2**: 167–174.
- Estrada-Johnson E, Csukasi F, Pizarro CM, Vallarino JG, Kiryakova Y, Vioque A, Brumos J, Medina-Escobar N, Botella MA, Alonso JM, Fernie AR, Sánchez-Sevilla JF, Osorio S, Valpuesta V.** 2017 Transcriptomic análisis in strawberry fruits reveals active auxin biosynthesis and signaling in the ripe receptacle. *Frontiers in Plant Science* **8**: 889.
- 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** 2018. 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.
- Ferrer J.** 1997. Las células de los tejidos vegetales. Ed. Vedral.
- Filippone MP, Diaz Ricci J, Mamani de Marchese 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 TC, Mirbeth B, Rentsch J, Sutter C, Ring L, Flachowsky H, Habegger R, Hoffmann R, Hanke MV, Schwab W.** 2014. Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *New Phytologist* **201**: 440-451.
- 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 de-blossomed 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.
- Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K, Bleichr P, Kurze E, Helm D, Olbricht K, Darsow U, Ring J, Schwab W.** 2017. White-fruited strawberry genotypes are not *per se* hypoallergenic. *Food Research International* **100**: 748-756.

- Freshuelva** 2005. Asociación onubense de productores y exportadores de fresas. <http://www.freshuelva.es>
- Galli V, Messias RS, Guzman F, Perin EC, Margis R, Rombaldi C.** 2019. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. *Physiologia Plantarum* **166**: 979-995.
- 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.
- Garriga M, Raddatz N, Véry AA, Sentenac H, Rubio-Meléndez ME, González W, Dreyer I.** 2017. Cloning and functional characterization of *HKT1* and *AKT1* genes of *Fragaria* spp.- relationship to plant response to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **210**: 9-17.
- 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 & Function* **6**: 1386-1398.
- 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 forma 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.** 1997. 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 theirs 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 Physiology and Biochemistry* **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. *Journal of Plant Physiology* **170**: 696-706.
- Gu X, Zhihong G, Yan Y, Wang X, Qiao Y, Chen Y.** 2017. *RdREB1BI* enhances drought tolerance by activating AQP-related genes in transgenic strawberry. *Plant Physiology and Biochemistry* **119**: 33-42.
- Guo DL, Li Q, Zhao HL, Wang ZG, Zhang GH, Yu YH.** 2019. The variation of berry development and DNA methylation after treatment with 5-azaC on 'Kyoho' grape. *Scientia Horticulturae* **246**: 265-271.
- Hadfield KA, Dandekar AM, Romani RJ.** 1993. Demethylation of ripening specific genes in tomato fruit. *Plant Science* **92**: 13-18.
- 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.
- 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.
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G.** 2000. 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- $\beta$ -1,4-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology* **118**: 1307-1316.
- 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 (*Rpfl*) 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.
- Higuera JJ, Garrido-Gala J, Lekhou A, Arjona-Girona I, Amil-Ruiz F, Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, López-Herrera CJ, Caballero JL.** 2019. The strawberry FaWRKY1 transcription factor negatively regulates resistance to *Colletotrichum acutatum* in fruit upon infection. *Frontiers in Plant Science* **10**: 480.
- 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-Air radiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Science* **161**: 315-322.
- Hiwasa K, Rose JC, Nakano R, Inaba A, Kubo Y.** 2003. Differential expression of seven  $\alpha$ -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.
- 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 for 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.
- 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 day length-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *Plant Biology* **9**:18.
- 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](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.
- Jara K, Castro RI, Ramos P, Parra-Palma C, Valenzuela-Riffo F, Morales-Quintana L.** 2019. Molecular insights into FaEG1, a strawberry endoglucanase enzyme expressed during strawberry fruit ripening. *Planta*. **8**:140.
- Jetti RR, Yang E, Kurnianta A, Finn C, Qian MC.** 2007. Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis. *Journal of Food Science* **72**:487–496.
- 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, 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, Verhoeven M, Mullineaux P.** 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**: 754-758.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E.** 2012. A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Kalt W, Prange RK, Lidster PD.** 1993. Postharvest color development of strawberries: The influence of maturity, temperature and light. *Canadian 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.
- Kesici M, Ipek A, Ersoy F, Ergin S, Gülen H.** 2020. Genotype dependant gene expression in strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants under high temperature stress. *Biochemical Genetics* **58**: 848-866.
- 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.
- Koskela EA, Sønsteby A, Flachowsky H, Heide OM, Hanke MV, Elomaa P, Hytönen T.** 2016. TERMINAL FLOWER1 is a breeding target for novel everbearing trait and tailored flowering responses in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Dutch.) *Plant Biotechnology Journal* **14**:1852-1861.
- Larsen M, Poll L.** 1990. 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 auxin binding protein, and its expression in insect cells. *Plant Molecular Biology* **31**: 267-277.
- 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.
- Li L, Song J, Kalt W, Forney C, Tsao R, Pinto D, Chisholm K, Campbell L, Fillmore S, Li X.** 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.
- Liao X, Li M, Liu B, Yan M, Yu X, Zi H, Liu R, Yamamuro C.** 2018 Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. *Proceedings of the Natural Academy of Science* **49**: 11542-11550
- Liao WY, Lin LF, Jheng JL, Wang CC, Yang JH, Chou ML.** 2016. Identification of heat shock transcription factor genes involved in thermotolerance of octoploid cultivated strawberry. *International journal of Molecular Sciences*. **17**: 2130.
- Lim CW, Lee SC.** 2015. Arabidopsis abscisic acid receptors play an important role in disease resistance. *Plant Molecular Biology* **88**: 313-324
- Lingua G, Bona E, Manassero P, Marsano F, Tofeschini V, Cantamessa S, Copetta A, D'Agostino G, Gamalero E, Berta G.** 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonas increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria* × *ananassa* var Selva) in conditions of reduce fertilization. *International Journal of Molecular Science* **14**: 16207-16225.
- 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-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M.** 1999. Characterization of two divergent endo b-1,4 glucanase cDNA clones highly expressed in the non climateric 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, Blanco-Portales R, 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 characterization of an UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Physiology* **140**: 1047-1058.
- Luo J, Peng F, Zhang S, Xiao Y, Zhang Y.** 2020. The protein kinase FaSnRK1a regulates sucrose accumulation in strawberry fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*. **151**: 369-377.
- Luo Y, Ge C, Ling Y, Mo F, Yang M, Jiang L, Chen Q, Lin Y, Sun B, Zhang Y, Wang Y, Li M, Wang X, Tang H.** 2020. ABA and sucrose co-regulate strawberry fruit ripening and show inhibition of glycolysis. *Molecular Genetic and Genomics* **2**: 421-438.
- Ma C, Liang B, Chang B, Liu L, Yan J, Yang J, Yang Y, Zhao Z.** 2018. Transcriptome profiling reveals transcriptional regulation by DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine enhancing red pigmentation in bagged “granny smith” apples (*Malus domestica*). *International Journal of Molecular Science* **19**: 3133.
- 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, Gouin-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.
- Makinen KK, Söderling E.** 1980. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol and xylose 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.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB.** 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP- box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* **38**: 948–952
- Martín-Pizarro C, Trivino JC, Posé D.** 2018. Functional analysis of TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9 directed mutagenesis. *Journal of Experimental Botany* **70**: 885–895.
- 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.
- 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.
- Matzke MA, Mosher RA.** 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews in Genetic* **15**: 394–408.
- 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**: 479.
- 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, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Cumplido-Laso G, García-Caparrós N, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Franco A.** 2016. Extensive transcriptomics studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Functional and Integrative Genomics* **16**: 671-692.
- 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.
- Mehari-Haile Z, Nagpala-De Guzman EG, Moretto M, Sonogo P, Engelen K, Zoli L, Moser C, Baraldi E.** 2019. Transcriptome profiles of strawberry (*Fragaria vesca*) fruit interacting with *Botrytis cinerea* at different ripening stages. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1131.
- 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- $\beta$ -(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.
- Merchant 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.
- Merino MC, Guidarelli M, Negrini F, De Biase D, Pession A, Baraldi E.** 2019. Induced expression of the *Fragaria x ananassa Rapid alkalization factor-33-like* gene decreases anthracnose ontogenic resistance of unripe strawberry fruit stages. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1252-1263.
- Merlaen B, De Keyser E, Van Lebeke MC.** 2018 Identification and substrate prediction of new *Fragaria x ananassa* aquaporins and expression in different tissues and during strawberry fruit development. *Horticultural Research* **5**: 20.
- 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.

- Mills E, Madsen C, Shewry P, Wichers H.** 2003. Food allergens of plant origin—their molecular and evolutionary relationships. *Trends of Food Science and Technogy* **14**: 145–156.
- 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* **12**: 264-266.
- Misyura M, Colasanti J, Rothstein SJ.** 2013. Physiological and genetic analysis of *Arabidopsis thaliana* anthocyanin biosynthesis mutants under chronic adverse environmental conditions. *Journal of Experimental Botany* **64**: 229-240.
- 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 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.
- 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*. *Journal of Plant Physiology* **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". *Journal of Plant Research* **126**: 151-159.
- Nardi C, Villareal N, Opazo G, Martínez MA, Moya-León MA, Civello PM.** 2014. Expression of FaXTH1 and FaXTH2 genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. *Scientia Horticulturae* **165**: 112-122.
- 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.
- Nitsch JP.** 1950. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany* **37**: 211-215.
- Njuguna W, Liston A, Cronn R, Ashman TL, Bassil N.** 2013. Insight into phylogeny, sex function and age of *Fragaria* bases on whole chloroplast genome sequencing. *Molecular phylogenetics and evolution* **66**: 17-29.
- 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.

- Oliás JM, Sanz C, Ríos JJ, Pérez 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 TP, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14**: 61–80.
- 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 J, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, Pérez-Martínez JD, Escalante-Minakata MP, 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* **138**: 372–81.
- Osoario 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- $\beta$ -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* **171**: 640–646.
- 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.
- Paniagua C, Ric-Varas P, García-Gago JA, López-Casado G, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Schückerl J, Knox JP, Matas AJ, Quesada MA, Posé S, Mercado JA.** 2020. Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **71**: 7103–7117
- 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 ADPglucose pyrophosphorylase. *Molecular Breeding* **17**: 269–279.
- 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.
- 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.
- Perrote J, Gaston A, Potier A, Petit, A, Rothan C, Denoyes B.** 2016a. Narrowing down the single homeologous *FaPFRU* locus controlling flowering in cultivates octoploid strawberry using a selective mapping strategy. *Plant Biotechnology Journal* **14**: 2176-2189.
- Perrote J, Guédon Y, Gaston A, Denoyes B.** 2016b. Identification of successive flowering phases highlights a new genetic control of the flowering pattern in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **19**: 5643-5655.
- Pharis RP, King RW.** 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology* **36**: 517-568.
- 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 × 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.



- Ramos P, Parra Palma C, Figueroa CR, Zuñiga PE, Valenzuela-Riffo F, Gonzalez J, Gaete-Eastman C, Morales-Quintana L.** 2018. Cell wall-related enzymatic activities and transcriptional profiles in four strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars during fruit development and ripening. *Scientia Horticulturae* **283**: 325-332.
- 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 Journal* **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*. *Frontiers in Plant Science* **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.
- 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, 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* **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 B. 2009. Origin and evolution of the polyploid *Fragarias* species through phylogenetical analyses of GBSSI and DHAR low-copy nuclear genes. *Molecular and Phylogenetic Evolution* **3**: 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.
- Salinas N, Verma S, Peres N Whitaker VM. 2018. *FaRCa1*: a major subgenome-specific locus conferring resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberry. *Theoretical and Applied Genetics*. **132**: 1109-1120
- 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.
- Sánchez Sevilla JF, Vallarino J, Osorio S, Bombarely A, Posé D, Merchante C, Botella MA, Amaya I, Valpuesta V. 2017. Gene expression atlas of fruit ripening and transcriptome assembly from RNA-seq data in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Scientific Reports* **7**: 13737.
- Santi D, Norment A, Garrett C. 1984. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **81**: 6993-6997.
- Santiago-Doménech N, Jiménez-Bemúdez 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.
- Sargent DJ, Hadonou AM, Simpson DW. 2003. Development and characterization 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. 2004. Quantitative and qualitative differences in morphological traits revealed between diploid *Fragaria* species. *Annals of Botany* **94**: 787–796
- 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, Mischczak A, Plich H. 1992. The influence of auxins, exogenous ethylene and light on the biosynthesis of ethylene and CO<sub>2</sub> production in strawberry fruits. *Fruit Science Report* **19**: 47-61.
- Schaart JG, Dubos D, Romero De La Fuente I, van Houwelingen AMML, de Vos RHC, 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 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.
- 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 Fraa1. *Bioscience reports* **32**: 567-575.
- Severo J, Tiecher A, Chaves F, Silva J, Rombaldi C.** 2011. Gene transcript accumulation associated with physiological and chemical changes during developmental stages of strawberry cv. Camarosa. *Food Chemistry*. **126**: 995–1000.
- 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.
- 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 TL, 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.** 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* **74**: 69-76.
- 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.

- Song J, Du L, Li L, Campbell Palmer L, Forney CF, Fillmore S, Zhang ZQ, Li XH.** 2015a. Targeted quantitative proteomic investigation employing multiple reaction monitoring on quantitative changes in proteins that regulate volatile biosynthesis of strawberry fruit at different ripening stages. *Journal of Proteomics* **3**: 288-295.
- Song J, Du L, Li L, Kalt W, Campbell Palmer L, Fillmore S, Zhang Y, Zhang ZQ, Li XH.** 2015b. Quantitative changes in proteins responsible for flavonoid and anthocyanin biosynthesis in strawberry fruit at different ripening stages: A targeted quantitative proteomic investigation employing multiple reaction monitoring. *Journal of Proteomics* **3**:1-10.
- 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- $\beta$ -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* Schldtl. 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 iinumae* Makino. *Botanische Jahrbücher für Systematik* **126**: 163–175.
- Staudt GS, Dickore 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.
- Stresemann C, Lyko F.** 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*. **123**: 8-13.
- 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.

- Teneira T, Pimenta Lange MJ, Lange T, Bres C, Labadie M, Monfort A, Hernould M, Rothan C, Denoyes B.** 2017. A specific gibberellin 20-oxidase dictates the flowering-runnering decision in diploid strawberry. *Plant Cell* **29**: 2168-2182.
- Terry LA, Choje GA, Giné-Bordonaba J.** 2007 Effect of water deficit irrigation and inoculation with *Botrytis cinerea* on strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit quality. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **55**: 10812-10819.
- Teysier E, Boureauv L, Chen W, Lui r, Degraeve-Guibault C, Stammenti L, Hong Y, Gallusci P.** 2015. Epigenetic regulation during fleshy fruit development and ripening. *Applied Plant Genomics and Biotechnology* **8**: 133-151.
- 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.
- Todeschini V, AitLahmidi N, Mazzucco E, Marsano F, Gosetti F, Robotti E, Bona E, Massa N, Bonneau L, Marengo E, Wipf D, Berta G, Lingua G.** 2018. Impact if beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality and volatilome. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1611.
- Tosetti R, Elmi F, Pradas I, Cools K, Terry LA.** 2020 Continuous exposure to ethylene differentially affects senescence in receptacle and achene tissues in strawberry fruit. *Frontiers in Plant Science* **11**:174
- 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.  $\beta$ - 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.
- 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.
- Valenzuela Riffo F, Parra-Palma C, Ramos P, Morales-Quintana L.** 2020. Molecular and structural insights into FaEXPA5, and alpha-expansin protein related with cell wall disassembly during ripening of strawberry fruit. *Plant physiology and biochemistry* **154**:589-581.
- Vallarino JG, Merchante C, Sánchez-Sevilla JF, Balager MA, Pott, DM, Ariza MT, Casañal A, Posé D, Vioque A, Amaya I, Willmitzer L, Solano R, Sozzani R, Fernie AR, Botella MA, Giovannoni JJ, Valpuesta V, Osorio S** 2020. Characterizing the involvement of *FaMADS9* in the regulation of strawberry fruit receptacle development. *Plant biotechnology journal* **18**: 929-943.

- 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.
- Villarreal 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.
- Vesely J, Cihák A.** 1978. 5-Azacytidine: mechanism of action and biological effects in mammalian cells. *Pharmacology and therapeutics, Part A.* **2**: 813-840.
- 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 F, Zhang F, Chen M, Liu Z, Zhang Z, Fu J, Ma Y.** 2017. Comparative transcriptomics reveals differential gene expression related to *Colletotichum gloeosporoides* resistance in strawberry. *Frontiers in plant science* **8**: 779.
- Wang H, Zhang H, Yang Y, Li M, Zhang T, Liu J Dong J, Li J, Butelli E, Xue Z, Wang A, Wang G, Martin C, Jin W.** 2019. The control of red colour by a family of MYB transcription factors in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *Plant Biotechnology Journal* **18**:1169-1184.
- 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 Y, Zhang J, Cui W, Guan C, Mao W, Zhang Z.** 2017 Improvement in fruit quality by overexpressing miR399 a in woodland strawberry. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **65**:7361-7370.
- 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. *Molecular Planta* **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.

- Wei L, Mao W, Jia M, Xing S, Ali U, Zhao Y, Chen Y, Cao M, Dai Z, Zhang K, Dou Z, Jia W, Li B.** 2018a. FaMYB44.2, a transcriptional repressor, negatively regulates sucrose accumulation in strawberry receptacles through interplay with FaMYB10. *Journal of Experimental Botany* **20**: 4805-4820.
- Wei W, Cui MY, Yang H, Gao K, Xie YG, Jiang Y, Feng JY.** 2018b. Ectopic expression of *FvWRKY42*, a WRKY transcription factor from the diploid woodland strawberry (*Fragaria vesca*) enhances resistance to powdery mildew, improves osmotic stress resistances, and increases abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant science* **275**: 60-74.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N.** 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365–369.
- Wickland DP, Hanzawa Y.** 2015. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms. *Molecular plant* **8**: 983-997.
- 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.
- Williams BP, Pignatta D, Henikoff S, Gehring M.** 2015. Methylation- sensitive expression of a DNA demethylase gene serves as an epigenetic rheostat. *PLoS Genetics* **11**: e1005142.
- Woo HR, Dittmer TA, Richards EJ.** 2008. Three SRA- domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetic.* **4**: e1000156.
- Woolley LC, James DJ, Manning K.** 2001. Purification and properties of an endo- $\beta$ -1,4- glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene. *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 Of 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 M, 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.
- Xue S, Bors RH, Strelkov SE.** 2006. Resistance sources to *Xanthomonas fragariae* in non octoploid strawberry species. *HortScience* **40**: 1653–1656.
- Yamasaki A, Yamashita, M.** 1993. Changes in endogenous cytokinins during flower induction of strawberry. *Acta Horticulturae* **345**: 93-99.
- Yan JW, Ban ZJ, Lu HY, Li D, Poverenov E, Luo ZS, Li L.** 2018. The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **98**:4395-4402.

- Yanef 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.
- Yeh SY, Huang FC, Hoffmann T, Mayershofer M, Schwab W.** 2014. FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.) *Frontiers in Plant Science* **5**:518
- 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.
- Zabetakis I, Holden MA.** 1997. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *Journal Science Food Agriculture* **74**: 421–434.
- 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.
- Zhang J, Wang X, Yu O, Tang J, Gu X, Wan X, Fang C.** 2010. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1103-1118.
- 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.
- Zhang Y, Zhang Y, Lin Y, Luo Y, Wang Z, Chen Q, Sun B, Wang Y, Li M, Tang H.** 2019. A transcriptomic analysis reveals diverse regulatory networks that respond to cold stress in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *International journal of genomics*. **2019**: 7106092.
- Zhang Z, Shi Y, Ma Y, Yang X, Yin X, Zhang Y, Xiao Y, Liu W, Li Y, Li S, Liu Z, Grierson D, Allan AC, Jiang G, Chen K.** 2020. The strawberry transcription factor FaRAV1 positively regulates anthocyanin accumulation by activation of *FaMYB10* and anthocyanin pathway genes. *Plant biotechnology journal*. **11**: 2267-2279.
- Zhong S, Fei Z, Chen YR, Zheng Y, Huang M, Vrebalov J, McQuinn R, Gapper N, Liu B, Xiang J, Shao Y, Giovannoni JJ.** 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology* **31**: 154-159.
- Zhou HC, Li G, Zhao X, Li LJ.** 2015. Comparative analysis of polygalacturonase in the fruit of the strawberry cultivars. *Genetical Molecular Research*. **14**: 12776-12787.
- Zhou J, Wang G, Liu Z** 2018. Efficient genome-editing of wild strawberry genes, vector development, and validation. *Plant Biotechnology Journal* **16**: 1868–1877.
- Zhu YC, Zhang B, Allam AC, Lin-Wang K, Zhao Y, Wang K, Chen KS, Xu CJ.** 2020. DNA demethylation is involved in the regulation of temperature dependent anthocyanin accumulation in peach. *Plant Journal* **102**: 965-976.
- 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.



## **OBJECTIVES**

## OBJETIVES

**The objectives of this thesis were the following:****Chapter 1**

1.1.- Identification of the *PRE* genes in the strawberry genome and analysis of their transcriptional profiles in fruit receptacles, vegetative tissues and under different experimental conditions to characterize their spatio-temporal expression pattern and in response to hormones.

1.2.- Transitory knock-down of *FaPRE1* and transcriptomic analysis to determine the transcriptomic changes produced and identification of genes with expression altered by it.

1.3.- Determination of the putative *FaPRE1* role in the control of ripening process in strawberry fruit.

**Chapter 2**

2.1.- Functional characterization of strawberry *FaMYB123* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues and under different experimental conditions to characterize its spatio-temporal expression pattern and in response to hormones.

2.2.- Generation of stable strawberry transgenics plants with the *FaMYB123* expression silenced by RNAi and evaluation of their silenced degree.

2.3.- Gene expression and metabolomic analysis of transgenic strawberry fruits *FaMYB123*-RNAi to determine the putative regulatory role played for this transcription factor in the biosynthetic phenylpropanoid pathway.

2.4.- Determination of the possible interaction between *FaMYB123* and *FaHLH3* using yeast two hybrid (Y2H) studies.

**Chapter 3**

3.1.- Determination of the putative DNA methylation role on the control of ripening process by injecting of demethylating agent 5-azacytidine (AZA) to strawberry fruits.

3.2.- Evaluation of the strawberry fruit phenotypic and transcriptomic changes driven by the AZA injection.

3.3.- Determination of strawberry fruit metabolomic and hormonal profiles in response to AZA treatment.

**Chapter 4**

4.1.- Functional characterization of strawberry *FaCXE2* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative tissues and under different experimental conditions to determine its expression profiles and hormonal regulation.

4.2.- *In vitro* enzymatic characterization of FaCXE2 protein and determination of its enzymatic properties

4.3.- Determination of the metabolomic changes produced in strawberry fruit with the transiently silenced *FaCXE2* expression.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**





# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIALES

### 1.1. Material químico

#### 1.1.1. 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 ( $\text{LiCH}_3\text{COO}$ ) (Sigma)

Acetato sódico ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ) (Merck)

Acetato potásico ( $\text{KCH}_3\text{COO}$ ) (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 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (Sigma)

Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) (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- $\text{Na}_2$ ) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma)

Ácido 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 ( $\text{HNO}_3$ ) (Merck)

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

Ácido salicílico ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$ ) (Sigma)

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Panreac)

ADN de esperma de salmón (sigma)

ADN de fago I 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 ( $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$ ) (Sigma)  
Ascorbato sódico ( $C_6H_7NaO_6$ ) (Sigma)  
Adenosina 5'-trifosfato disódica (ATP) ( $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3$ ) (Sigma)  
Azacitidina ( $C_8H_{12}N_4O_5$ ) (Sigma)

## **B**

Bacto-triptona (Difco)  
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)  
6-bencil aminopurina (BA) ( $C_{12}H_{13}NO_2$ ) (Sigma)  
Bicarbonato sódico ( $NaHCO_3$ ) (Sigma)  
5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) ( $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ ) (Sigma)  
Butanol terciario (*tert*-Butanol) ( $C_4H_{10}O$ ) (Merck)

## **C**

Carbenicilina ( $C_{26}H_{25}N_2NaO_6S$ ) (Duchefa)  
Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) (Sigma)  
Cloranfenicol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ) (Sigma)  
Cloroformo ( $CHCl_3$ ) (Merck)  
Cloruro cálcico ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ ) (Sigma)  
Cloruro de cobalto ( $CoCl_2 \times 6H_2O$ ) (Sigma)  
Cloruro de litio (LiCl) (Merck)  
Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) (USB)  
Cloruro potásico (KCl) (Merck)  
Cloruro sódico (NaCl) (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)  
Dietyl pirocarbonato ( $C_6H_{10}O_5$ ) (DEPC) (Sigma)  
N-N-dimetilformamida ( $C_3H_7NO$ ) (Merck)  
Dimetil sulfóxido (DMSO) ( $C_2H_6SO$ ) (Sigma)  
DNasa I RNasa free (Invitrogen<sup>TM</sup>)  
Ditiotreitol (DTT) ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) (Sigma)  
Dodecil sulfato sódico (SDS) ( $C_{12}H_{25}O_4SNa$ ) (Sigma)

## **E**

*EcoRI* (NEB)  
Espectinomicina diclorhidrato pentahidrato ( $C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$ ) (Sigma)  
Estreptomomicina sulfato ( $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ ) (Sigma)  
Etanol absoluto ( $CH_2OH$ ) (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)

Extracto de levadura (Difco)

## **F**

Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck)

Fosfatasa alcalina de timo de ternera (CIAP)(Invitrogen™)

Fosfato monosódico diácido (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Panreac)

Fosfato disódico monoácido (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Panreac)

Fosfato sódico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma)

Fosfato potásico monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma)

## **G**

Gentamicina sal de sulfato (C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) (Sigma)

Glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (Panreac)

Glicina (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>COOH) (Merck)

Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma)

Glutati3n reducido (Sigma)

GST-Sepharose (Novogen)

## **H**

Hexadeciltrimetil-amonio bromido (CTAB) (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>NBr) (Sigma)

Hidr3xido s3dico (NaOH) (Panreac)

Hidr3xido potásico (KOH) (Panreac)

## **I**

Isoamil acetato (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma)

Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH) (Merck)

Isopropil-b-D-tiogalact3sido (IPTG) (C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S) (Pharmacia)

## **K**

Kanamicina monosulfato (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O) (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-Tript3fano (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 ( $\beta$ -mercaptoetanol) ( $C_2H_6OS$ ) (Sigma)

Metanol ( $CH_3OH$ ) (Panreac)

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 ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) (Sigma)

Nitrato potásico ( $KNO_3$ ) (Panreac)

## **O**

$\beta$ -octil glucósido ( $C_{14}H_{28}O_6$ ) (Sigma)

Óxido de deuterio (agua pesada) ( $D_2O$ ) (Sigma)

## **P**

Piridoxina (vitamina B6) ( $C_8H_{11}NO_3$ ) (Sigma)

Polietilenglicol 3350 (PEG-3350) (Panreac)

Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) (Panreac)

Progel Tris-Glycin 12% 1.0 mm (ANAMED)

1-Propanol ( $C_3H_7OH$ ) (Merck)

## **R**

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

Rifampicina ( $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ ) (Duchefa)

RNasa OUT™ (Invitrogen™)

RNasa pancreática (Pharmacia)

## **S**

Sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Sigma)

Sepharose GST-Bind™ Resin (Novogen)

Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma)

Sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) (Sigma)

Sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Panreac)

Sulfato de manganeso ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) (Sigma)

Sulfato de zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Panreac)

Sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Sigma)

SYBR-Green I (Molecular Probes)

## **T**

Tetrahidrato de cloruro de manganeso ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) (Sigma)

Tiamina (vitamina B1) ( $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ ) (Duchefa)

Tricina ( $C_6H_{13}NO_5$ ) (Sigma)

Titriplex (Merck)

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

Tritón X-100 (Sigma)

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

## V

9-*cis*-violaxantina

## X

*Xho*I (NEB)

## Z

9-*cis*-zeaxantina

### 1.1.2. Antibióticos utilizados

Los antibióticos empleados fueron disueltos siguiendo las fichas técnicas y esterilizados por filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Una vez esterilizados, se repartieron en alícuotas de 1 ml y se mantuvieron almacenados a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. La concentración de almacenamiento de los antibióticos se recoge en la Tabla 1.

*Tabla 1: Antibióticos usados en este trabajo.*

Antibiótico	Solvente	Concentración de almacenamiento	Concentración final
Ampicilina (Sigma)	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$
Kanamicina (Duchefa)	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50-100 $\mu\text{g/ml}$ (microorganismos) 25-100 mg/l (plantas)
Rifampicina (Duchefa)	DMSO	100 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$
Carbenicilina (Duchefa)	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	250-500 mg/l (plantas)
Cloranfenicol (Sigma)	EtOH	15 mg/ml	15 $\mu\text{g/ml}$
Estreptomina (Sigma)	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$
Espectinomicina (Sigma)	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$
Gentamicina (Sigma)	H <sub>2</sub> O	15 mg/ml	15 $\mu\text{g/ml}$ (bacterias) 10 $\mu\text{g/ml}$ (levaduras)

### 1.1.3. Kits de biología molecular

*Fruit-Mate*<sup>TM</sup> for RNA purification (TaKaRa)

*Gateway*<sup>®</sup> BP Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix (Invitrogen<sup>TM</sup>)

*Gateway*<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> Enzyme mix (Invitrogen<sup>TM</sup>)

*GeneJET* Gel Extraction Kit (Quiagen)

*GeneJET* PCR Purification Kit (Quiagen)

*GeneJET* Plasmid Miniprep Kit (Quiagen)

*iProof*<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)

*iQ*<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad)

*Maxwell*<sup>®</sup> RSC Plant RNA (Promega)

*One Library Efficiency DH5a. Chemically Competent Cells (Invitrogen™)*

*One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen™)*

*Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)*

*QIAGEN® Plasmid Mini Kit (Qiagen)*

*QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen)*

*RNeasy® Mini Kit (Qiagen)*

*SsoAdvanced™ SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad)*

## **1.2. Material biológico**

### **1.2.1. Material vegetal**

Todo el material vegetal empleado procede de plantas de fresa (*Fragaria × ananassa*) del cultivar Camarosa y Fortuna, 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, raíces, pétalos, pedicelos, flores y botones florales. 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 en frutos y transformación estables (*Materiales y Métodos, Apartado 2.10.2 y 2.9.4.2.*) se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria × ananassa*) del cultivar Chandler y para los experimentos realizados para la determinación de ABA (*Materiales y Métodos, Apartado 2.14.2*) se utilizaron plantas 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 (Múnich, Alemania).

Los estadios de desarrollo y maduración de los frutos se establecieron en función de los siguientes parámetros (Figura 1):

- Verde-1 (V1): fruto pequeño con color verde en primera fase de crecimiento, con aquenios 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.



**Figura 1.** Estadios de desarrollo y maduración del fruto de fresa (*Fragaria × ananassa* “Camarosa”).

### 1.2.2. Estirpes bacterianas

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$ :** *F*- *supE44* *DlacU169* ( $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*) *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. La delección  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15* permite la  $\alpha$ -complementación con el extremo amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por vectores del tipo pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

***Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS** (Invitrogen<sup>™</sup>): *F*-, *ompT*, *hsdS* (*rB*-, *mB*-), *gal* (53, 54). Cepa deficiente en las proteasas *Ion* 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 (*Cmp*).

***Escherichia coli* BL21 (TOP10)** (Invitrogen<sup>™</sup>): *F*- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacZ74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*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<sup>™</sup>). 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* GV3101** (Koncz y Schell, 1986): *pTiC58* $\Delta$ *T-DNA* *Rif<sup>r</sup>* *Gent<sup>r</sup>* *Kan<sup>r</sup>*. 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): *EHA101**pTibO542*  $\Delta$ *T-region* *Mop+*. Estirpe bacteriana resistente a rifampicina y empleada en la transformación y obtención

de plantas transgénicas de fresa. Contiene el plásmido Ti desarmado pTibO542ΔT 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.

### 1.2.3. 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* (Cedida por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding).

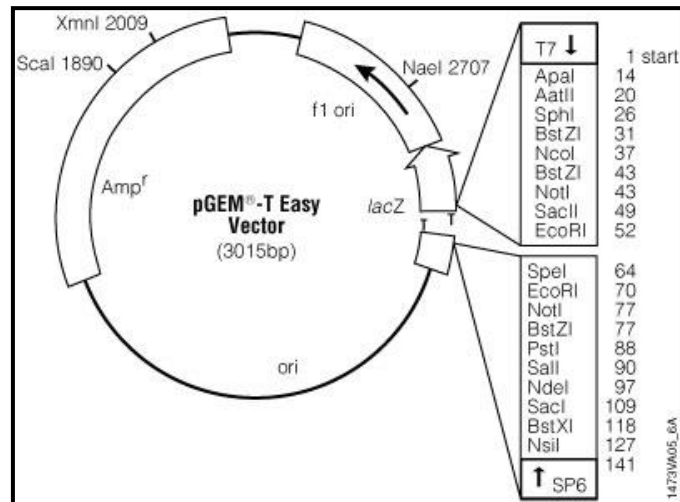
*Saccharomyces cerevisiae* **PJ69-4a**: *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 Δgal4 Δgal80 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ* (Cedida por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding).

### 1.3. Vectores de clonación

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy** (Promega). El vector pGEM<sup>®</sup>-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 con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. Además, la posición 3' de los extremos romos resultantes de la actuación de la enzima han sido modificados químicamente adicionando dos restos de desoxitimidina. 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 deoxiadenosina 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 enzimas de restricción distintas. En los extremos de este, aparecen cuatro secuencias promotoras diferentes (cebadores *Reverse M13*, *Forward M13*, *T3* y *T7*). El sitio de clonación múltiple interrumpe la secuencia génica del fragmento amino terminal  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa susceptible de ser  $\alpha$ -complementado por el fragmento  $\omega$  existente en el genoma de la célula hospedadora, lo que facilita la selección de recombinantes mediante IPTG y X-Gal. Además, el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy confiere resistencia al antibiótico ampicilina a las células bacterianas que lo contienen.





**Figura 2.** Vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

**pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>™</sup>). 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 unidos covalentemente a la enzima 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 deoxiadenosina 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 clonaje en el vector plasmídico.

Junto al sitio de subclonaje del producto de PCR en el plásmido, se encuentran los sitios *attL Gateway<sup>®</sup>* (Invitrogen<sup>™</sup>). Esto permite que el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> pueda ser empleado como un *Entry vector* en el sistema de subclonaje *Gateway<sup>®</sup>* (Invitrogen<sup>™</sup>) (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<sup>®</sup>* (Invitrogen<sup>™</sup>). 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<sup>™</sup>221** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>™</sup>). Este vector (Figura 3B) se empleó para la clonación de fragmentos de ADN amplificados mediante 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<sup>®</sup>*. 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.

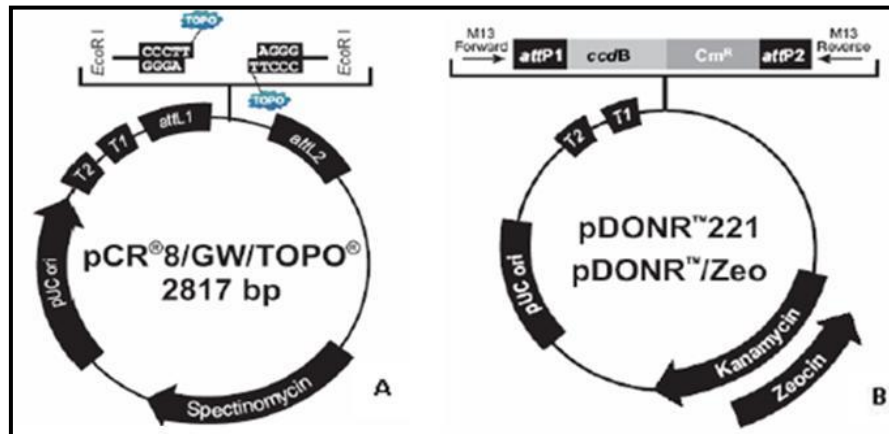


Figura 3. A) Vector de clonación pCR®8/GW/TOPO®. B) Vector de clonación pDONR™221.

### 1.3.1. Vectores de expresión de proteínas

**pGEX-4T-1** (Amersham) (Figura 4). Este vector se emplea en la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* mediante el subclonaje del correspondiente ADNc en el sitio de clonaje múltiple. La expresión de la proteína está bajo control del promotor *lac* que se induce en presencia del análogo de la lactosa isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosido (IPTG). Todos los vectores pGEX incluyen el gen interno *lacIq* cuyo producto es una proteína represora que se une al operador del gen *lac* evitando la expresión del inserto hasta la adición de IPTG y, controlando así, su expresión.

Este vector contiene además el gen de fusión *glutación S-transferasa* (*GST*) que lo convierte en un sistema muy versátil de expresión, purificación y detección de proteínas producidas en *E. coli*. El sistema se basa en la expresión inducible de altos niveles de proteína recombinante, que conserva siempre su actividad enzimática, fusionada a la GST en el extremo amino terminal. Posteriormente, la proteína de fusión obtenida se purifica a partir de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad utilizando glutatión reducido, lo que 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 GST se puede eliminar mediante digestión con la proteasa trombina y liberar así la proteína recombinante de interés para usos posteriores. En general, cualquier proteína de fusión puede ser detectada mediante colorimetría o empleando métodos inmunológicos.

En cualquier caso, las construcciones pGEX-4T-1-ADNc obtenidas se transforman preferentemente en la estirpe bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, resistente a cloranfenicol. 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'.

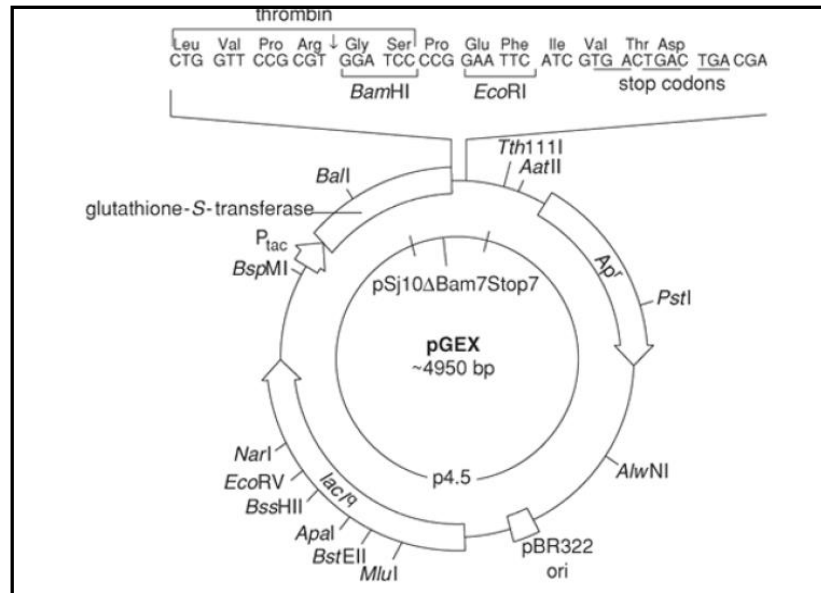


Figura 4. Vector de expresión pGEX-4T-1.

**pDEST<sup>TM</sup>22** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>TM</sup>) (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding) (Figura 5). Es un vector de expresión de proteínas en levaduras que se emplea como *destination vector* en la metodología *Gateway<sup>®</sup>* (Invitrogen<sup>TM</sup>). La secuencia completa codificante de los genes a estudiar mediante doble híbrido en levaduras se transfiere desde el vector pDONR<sup>TM</sup>221 usando 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<sup>R</sup>-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 por triptófano.

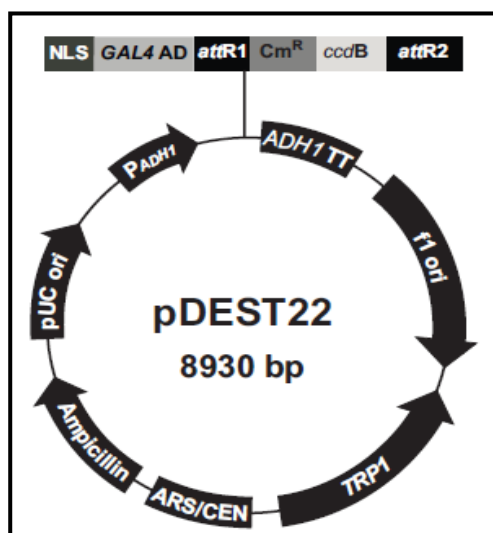


Figura 5. Vector pDEST<sup>TM</sup>22.

**pDEST<sup>TM</sup>32** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>TM</sup>) (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<sup>®</sup>* (Invitrogen<sup>TM</sup>). La secuencia codificante de los genes a estudiar mediante el doble híbrido en levaduras se transfiere desde el vector pDONR<sup>TM</sup>221 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<sup>R</sup>-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 por leucina para la selección en levaduras *S. cerevisiae* cepa PJ69-4a.

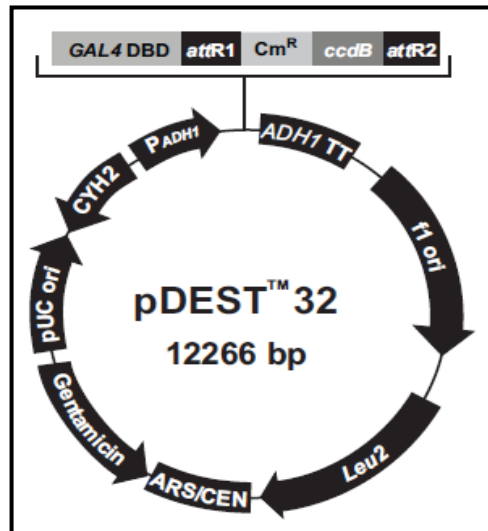
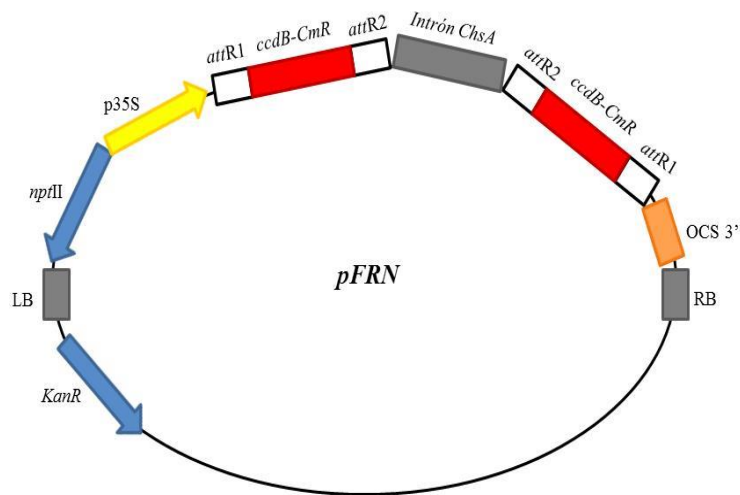


Figura 6. Vector pDEST™32.

### 1.3.2. 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*<sup>®</sup> (Invitrogen™) (Figura 7). 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.

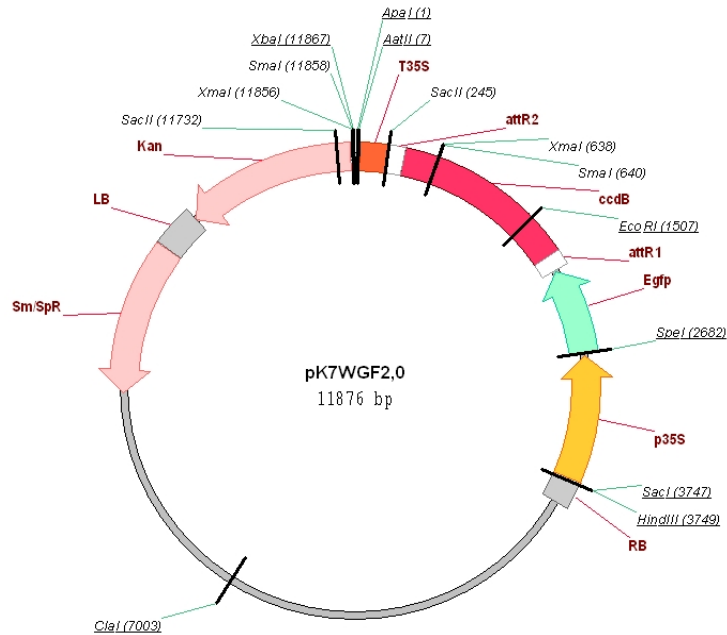
Este vector es una modificación del vector pFGC5941 (ChromDB) en el que se ha sustituido el gen *bar*, que confiere resistencia a basta, por el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina en la planta transgénica que lo contiene. Posee además cuatro sitios *attR Gateway* en posiciones invertidas (*attR1-attR2* y *attR2-attR1*), de manera que el inserto es subclonado en orientación antisentido y sentido simultáneamente. Así, se produce la formación de moléculas de ARN de doble cadena (ARNds) desencadenantes del silenciamiento génico por ARNi. Entre las dos regiones *attR Gateway*<sup>®</sup> y separándolas entre sí, se encuentra la secuencia correspondiente a un 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 7.** 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 las estirpes de *E. coli* (ej. DH5 $\alpha$  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*<sup>®</sup> (*Materiales y Métodos*, apartado 2.9.2.1). 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 8). Este vector binario se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). 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*<sup>™</sup>, 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<sup>R</sup>-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.



**Figura 8.** Vector de expresión pK7WGF2.0.

**pE-SPYNE-Gw y pE-SPYCE-Gw** (Cedidos por los Dr. Caroline Mayer and Wolfgang Dröge-Laser, Universidad de Wurzburg) (Figura 9). Este vector binario se emplea como *destination vector* en la metodología *Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). Se utiliza en la transformación de plantas para la sobreexpresión de genes de interés dirigida por el promotor 35S, además posee la mitad amino (SPYNE) y carboxilo (SPYCE) del gen reportero YFP situado a continuación del promotor 35S y fusionado en el mismo marco de lectura que nuestro gen de interés. Así, *in vivo*, si se produce interacción entre las proteínas codificadas por ambos vectores, se reconstituye la proteína fluorescente YFP. 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*<sup>™</sup>, 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<sup>R</sup>-attR2*) cuyas características se han explicado anteriormente. Para su selección en bacterias este vector contiene además un gen marcador de resistencia a ampicilina.

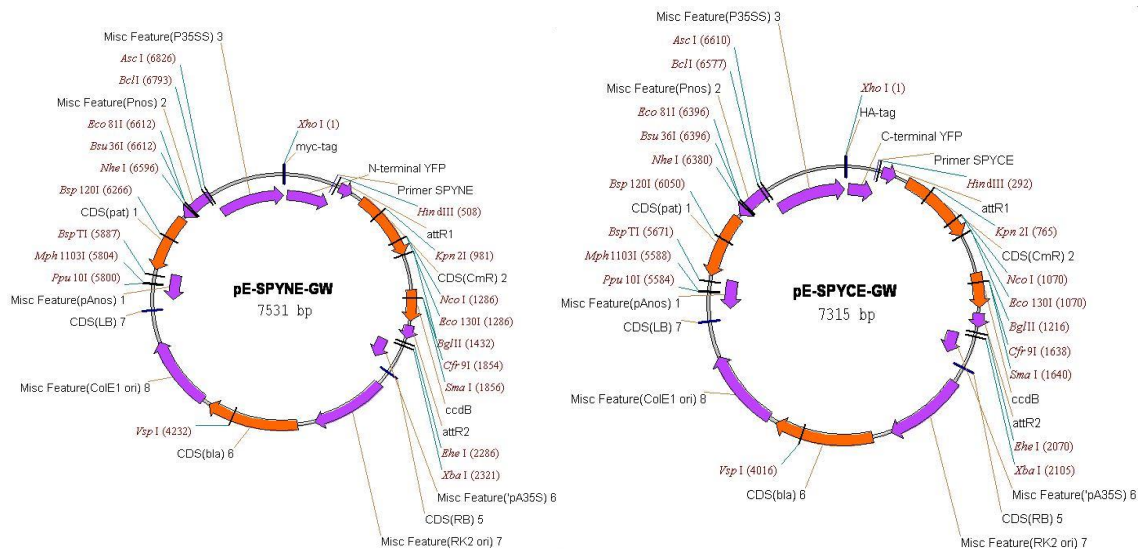


Figura 9. Vector de expresión pE-SPYNE-Gw y pE-SPYCE-Gw.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Condiciones de cultivo de las estirpes bacterianas

Los cultivos líquidos de *E. coli* se crecieron siempre en un incubador orbital, 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 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. 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).

#### 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  
 H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar el volumen final. Ajustar a pH 7,5 con NaOH

##### LB sólido (Autoclave)

Medio LB  
 Agar 1,5% (p/v)



## 2.2. 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. El medio de cultivo empleado fue SD glu suplementado con los aminoácidos adecuados. 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).

### 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  
H<sub>2</sub>O 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	I2752
L-Valina	1500	V0500
L-Adenina	200	A9126
L-Arginina HCl	200	A5131
L-Histidina HCl Monohidrato	200	H8125
L-Leucina	1000	L8000
L-Lisina HCl	300	L5626
L-Metionina	200	M9625
L-Fenilalanina	500	P2126
L-Treonina	2000	T8625
L-Triptófano	200	T0254
L-Tirosina	300	T3754
L-Uracilo	200	U0750

## 2.3. Obtención de células competentes y transformación de bacterias

### 2.3.1. Preparación de células competentes permanentes de *E. coli*

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<sub>600</sub> = 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  $\mu$ l y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Las células competentes *E.coli* DH5 $\alpha$  así preparadas se utilizaron para transformaciones convencionales, mientras que las células competentes *E.coli* BL21 se emplearon en la transformación con los plásmidos vacíos, para mantener el gen *ccdB* en su interior. 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™).

**Apéndice 3: Soluciones empleadas en la preparación de células competentes**

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

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

**2.3.2. 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  $\mu$ l), la muestra de ADN (~50 ng) que se deseaba transformar se mezcló con una parte alícuota de células competentes (100  $\mu$ l). 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 a 15.000 g a temperatura ambiente y se volvieron a resuspender en 150  $\mu$ l 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 4: 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<sub>2</sub> 10 mM  
 MgSO<sub>4</sub> 10 mM  
 Glucosa 20 mM

### 2.3.3. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens* 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* a 28 °C en 50 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes según la cepa (*Materiales y Métodos, apartado 1.2.2*). Una vez alcanzada una DO<sub>600</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> 20 mM frío. La suspensión celular obtenida se distribuyó en alícuotas de 200 µl y almacenada a -80°C hasta su uso.

### 2.3.4. 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, se resuspendieron en 100 µl de LB fresco, y se sembraron en placas de LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas se depositaron en una estufa a 28 °C y las células se dejaron crecer entre 48-72 horas.

### 2.3.5. 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.

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<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> 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 pDEST<sup>™</sup>22, pE-SPYNE-Gw y pE-SPYCE-Gw la selección de los transformantes positivos se realizó en presencia de ampicilina (100 µg/ml), mientras que los transformantes portadores del vector pDONR<sup>™</sup> 221 y del vector binario pFRN se seleccionaron en presencia de kanamicina (50 µg/ml), y los transformantes con el vector pDEST<sup>™</sup> 32 se seleccionaron en presencia de gentamicina (25 µg/ml) (*Materiales y Métodos, apartado 1.3.2*).

Las cepas de *A. tumefaciens* empleadas presentan, además, resistencia a rifampicina (AGL0); rifampicina, gentamicina y kanamicina (GV3101). 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 1.3.2*).

### **2.3.6. Identificación de transformantes positivos**

#### **2.3.6.1. 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 usando kits comerciales y se digirió con la enzima de restricción adecuada para liberar el inserto o un fragmento de éste (*Materiales y Métodos, apartado 2.5.3*). Posteriormente, éste se visualizó electroforéticamente en gel de agarosa (*Materiales y Métodos, apartado 2.7.1*).

#### **2.3.6.2. 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) y/o cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia interna del inserto. La reacción de PCR se realizó como se indica en *Materiales y Métodos, apartado 2.5.5*) 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 sólido con el antibiótico de selección para mantener la línea celular.

## 2.4. Obtención de células competentes y transformación de levaduras

### 2.4.1. Obtención de células competentes y transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levaduras PJ69-4a y PJ69-4 $\alpha$  se dejaron crecer a 30 °C durante 24 horas en medio SD completo hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> 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 acetato de litio 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 (apéndice 5), se mantuvieron en agitación en vórtex por 1 minuto y se dejaron incubar durante 20 min a 42 °C. Las células fueron recogidas de nuevo por centrifugación, resuspendidas finalmente en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MQ, plaqueadas en medio SD de selección e incubadas durante 3 días a 30 °C.

<b>Apéndice 5: Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a pequeña escala</b>
240 $\mu$ l PEG 50% (PEG 3350)
36 $\mu$ l 1 M LiAc
5 $\mu$ l ADN esperma de salmón (10mg/ml)
3 $\mu$ l ADN plasmídico (~500 ng)
76 $\mu$ l H <sub>2</sub> O MQ
360 $\mu$ l volumen total

### 2.4.2. Selección por aminoácidos

La selección de los transformantes positivos se realizó en medio selectivo SD glu 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 pDEST<sup>TM</sup>22 confiere viabilidad a los transformantes en ausencia de triptófano mientras que el vector pDEST<sup>TM</sup>32 confiere viabilidad a los transformantes en ausencia de leucina. Por tanto, los transformantes diploides que portaban ambos vectores fueron seleccionados en medio SD glu en ausencia de leucina y triptófano.

## 2.5. Manipulación de moléculas de ADN

### 2.5.1. 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 2.3.6*); c) en estudios de expresión de los genes objeto de estudio mediante qRT-PCR (*Materiales y Métodos, apartado 2.8.3*).

### 2.5.1.1. 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<sup>®</sup>-T Easy, pGEX-4T-1, pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> y pDONR<sup>™</sup>221 (*Materiales y Métodos, apartados 1.3.2 y 1.3.3*) La temperatura de anillamiento siempre fue 55 °C y el programa de PCR empleado el que se detalla en la Tabla 4.

**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'

### 2.5.1.2. 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 *Primer designing tool* del NCBI o *Primer 3* (Tabla 3). 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
pK7WGF2.0	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 <sup>™</sup> 22	PRO500	5' - GCG TTT GGA ATC ACT ACA GG - 3'
	PRO501	5' - AAC CTC TGG CGA AGA AGT CC - 3'
pDEST <sup>™</sup> 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	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'

Los cebadores 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.

Aunque todos los cebadores específicos fueron diseñados para trabajar con un rango de temperatura de anillamiento amplio (52-62 °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 (Apéndice 6). La mezcla de reacción incluyó:

<b>Apéndice 6: Mezcla de reacción de PCR</b>		
Tampón de PCR	[10X]	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O bidestilada estéril		hasta 25 µl

**Apéndice 7: 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)

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 <sup>a</sup> anillamiento	30 seg - 1 min	
72 °C	1-2 min	
72 °C	5-10 min	1
10 °C	Mantenido	1

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 2.7.1*).

## **2.5.2. Purificación de fragmentos de ADN**

### **2.5.2.1. 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 *Thermo Fisher GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher)*, siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial.

### **2.5.2.2. Purificación de ADN a partir de una solución acuosa**

El uso del sistema *Thermo Fisher GenJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher)* permitió una eficaz purificación de fragmentos de ADN presentes en soluciones acuosas (productos de PCR, fragmentos resultantes de digestiones con endonucleasas, etc). El proceso se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones suministradas por la casa comercial. El ADN se recuperó directamente en H<sub>2</sub>O estéril.

## **2.5.3. Concentración de muestras de ADN**

### *Precipitación con etanol y acetato sódico*

Las muestras de ADN disueltas en H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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).

#### **2.5.4. 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 2.7.1*) de una parte alícuota de dicha muestra junto a la misma muestra sin digerir.

<b>Apéndice 8: Mezcla de digestión enzimática</b>	
ADN (0,5-1 μg)	x μl
Tampón [10X]	2 μl
Enzima de restricción (5U)	0,5 μl
H <sub>2</sub> O bidestilada	hasta 20 μl

#### **2.5.5. 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 2.5.3*).

**Apéndice 9: Enzimas empleadas en la desfosforilación y ligación de moléculas de ADN**

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

*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:

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

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 a 16 °C durante 14-16 horas antes de proceder a la transformación de células de *E. coli*.

**Apéndice 10: Reacción de ligación**

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

**2.5.6. 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 (Thermo Fisher)* y posteriormente analizadas con el programa *Chromas*.

## 2.6. Aislamiento de ácidos nucleicos

### 2.6.1. Extracción de ARN

#### 2.6.1.1. 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 trataron 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 esterilizaron en autoclave. Los tampones que contenían Tris-HCl en su composición fueron preparados con agua estéril previamente tratada con DEPC y posteriormente se esterilizaron 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 CO<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>OH.

*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.

### 2.6.2. Obtención y purificación de ARN

#### 2.6.2.1. 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 N<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O-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 H<sub>2</sub>O-DEPC. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm. El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso.

**Apéndice 11: Soluciones utilizadas para la obtención y purificación de ARN**

**Tampón de extracción cloroformo:alcoholisoamílico**

Tris-HCl pH 8,2 100 mM

EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8 20 mM

NaCl 1,4 M

CTAB 2 % (p/v)

$\beta$ -mercaptoetanol 1 % (v/v)

**2.6.2.2. Purificación de ARN con el método CTAB**

Debido a que el método descrito anteriormente requiere de múltiples pasos y parte de una cantidad alta de tejido fresco, se adoptó otro método de extracción adaptado por lo descrito en Gambino *et al.*, 2008. En resumen, aproximadamente 100 mg de tejido se extrajeron en 900 µL de tampón de extracción (2% CTAB, 2.5% PVP-40, 2M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 8, 0.25M EDTA pH 8 y 2%  $\beta$ -mercaptoetanol), incubados a 65 °C con agitación esporádica. Posteriormente se añadió un volumen similar de cloroformo y se centrifugó a 11.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se precipitó diferencialmente el ARN con LiCl 3M, a 4 °C durante al menos 30 minutos. La mezcla se centrifugó y a 21.000 g durante 20 minutos a 4 °C y el pellet se resuspendió en 500 µL solución SSTE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8, 1% SDS, 1M NaCl), previamente calentado a 65 °C. Se añadió un volumen igual de cloroformo y la mezcla se centrifugó a 11.000g durante 10 minutos. El sobrenadante se añadió a un tubo limpio al que se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol frío. Finalmente, el ARN se precipitó por centrifugación a 4 °C. El ARN obtenido se lavó sucesivamente con 1 ml de etanol 70% y

100%, y finalmente se resuspendió en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm. El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### 2.6.2.3. Extracción automatizada de ARN

Adicionalmente, también se puso a punto la extracción automatizada de ARN de alta calidad usando el aparato Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega). Este aparato permite extraer de manera simultánea hasta 16 muestras de ARN de una vez. Las muestras se extraen en unos cartuchos que contienen los reactivos necesarios, así como partículas magnéticas que se unirán a los ácidos nucleicos. De esta manera, debido a que el Maxwell<sup>®</sup> RSC no tiene intercambio de líquidos, sino que son las partículas metálicas las que capturan el ARN, hay un riesgo mínimo de contaminación entre las muestras.

La preparación de la muestra se realizó adicionando 1 mL del buffer *Fruit-Mate™ for RNA Purification* (TaKaRa) a 100 mg de tejido previamente machacado. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se tomaron 500  $\mu$ L del sobrenadante al que se le añadió 300  $\mu$ L del tampón de lisis del kit *RSC Plant RNA* (Promega). La mezcla se añadió en el cartucho adaptado para la máquina y se cargó en la misma. El protocolo de extracción hace pasar a la mezcla por los diferentes pocillos de los cartuchos para finalmente eluir el ARN en agua. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría, midiendo su absorbancia a 260 nm. El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### 2.6.3. Extracción 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.

### 2.6.4. 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  $50 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  y para el ARN de  $40 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$ , para ello se usó 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  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{230\text{nm}}$  nos indica la presencia de polisacáridos frente a ácidos nucleicos y su valor recomendado es  $\sim 2$ . La relación  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$  indica la presencia de proteínas frente a ácidos nucleicos y su valor recomendado es también  $\sim 2$ . Fue absolutamente imprescindible tener en cuenta estos valores en experimentos de RT-PCR para que las muestras de ARN empleadas fueran retrotranscribibles.

## **2.7. Separación electroforética de ácidos nucleicos**

### **2.7.1. 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 el agente intercalante RedSafe (IntronBio) 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 80 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  $\lambda$  digerido con *Hind* III (Pharmacia) y *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>).

### **2.7.2. 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 2.6.1.1*). La muestra de ARN se cargó en el 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 corta-media). 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.

<b>Apéndice 12: Soluciones empleadas en la electroforesis de ácidos nucleicos</b>	
Para las muestras de ARN se utilizó el mismo tampón de carga tratado con DEPC al 0,1% (v/v) y autoclavado posteriormente	
<b>Tampón TBE [1X]</b>	<b>Tampón de carga [10X]</b>
Tris 44 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 90 mM EDTA-Na <sub>2</sub> 2,2 mM Ajustar pH 8	Glicerol 50% Azul de bromofenol 0,25% (p/v) Xilen-cianol (opcional) 0,25% (p/v)

## 2.8. Estudios de expresión génica

### 2.8.1. Tratamiento del ARN con *DNasaI*

Previamente a su retrotranscripción, todas las muestras de ARN usadas se trataron con *DNasaI* libre de *RNasas* (Invitrogen™) 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 40-50 µg de ARN total.

<b>Apéndice 13: Tratamiento de ARN con <i>DNasaI</i></b>	
Muestra de ARN total (40-50 µg)	× µl
Tris-HCl [1M] pH 7,5	4 µl
MgCl <sub>2</sub> [0,1 M]	6 µl
<i>DNasaI</i> ( <i>RNasa free</i> ) (Invitrogen™) [7,5 U/ml]	1 µl
H <sub>2</sub> 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 según lo descrito en *Materiales y métodos, Apartado 2.5.1*. El ARN precipitado se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril tratada con DEPC. La concentración y el grado de pureza del ARN tratado y precipitado se determinaron con un espectrofotómetro *NanoDrop (ND-100 Spectrophotometer)*. La integridad de las muestras se determinó mediante su visualización en gel de agarosa al 1%.

### **2.8.2. 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 2.6.4*). Otro método de determinar la pureza del ARN fue la determinación del RIN (*RNA integrity number*), mediante electroforesis capilar se separan los ARN ribosómicos y se determina el valor RIN según la concentración de ambos. Este valor varía de 1 a 10, siendo 1 un ARN altamente degradado y 10 un ARN nada degradado. En nuestros estudios, sólo se usaron ARN con un RIN >8. Esta determinación se realizó en el servicio de genómica del servicio central de apoyo a la investigación (SCAI, UCO). Finalmente, y una vez comprobada la calidad de la muestra, el volumen total se diluyó hasta una concentración de trabajo de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### **2.8.3. 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 e 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-Green I*. Este compuesto 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, se detectó 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. 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.

#### **2.8.4. Reacción de retrotranscripción**

La retrotranscripción de las muestras a analizar se realizó empleando el kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). La enzima empleada es una transcriptasa reversa que combina alta sensibilidad y alta termoestabilidad, llegando a sintetizar productos de ADNc de gran longitud (hasta 14 kb) empleando una mezcla equimolar de cebadores, tanto oligo (dT)<sub>18</sub>, como *random primers*, una combinación de oligos de 6 nucleótidos incluidos 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.

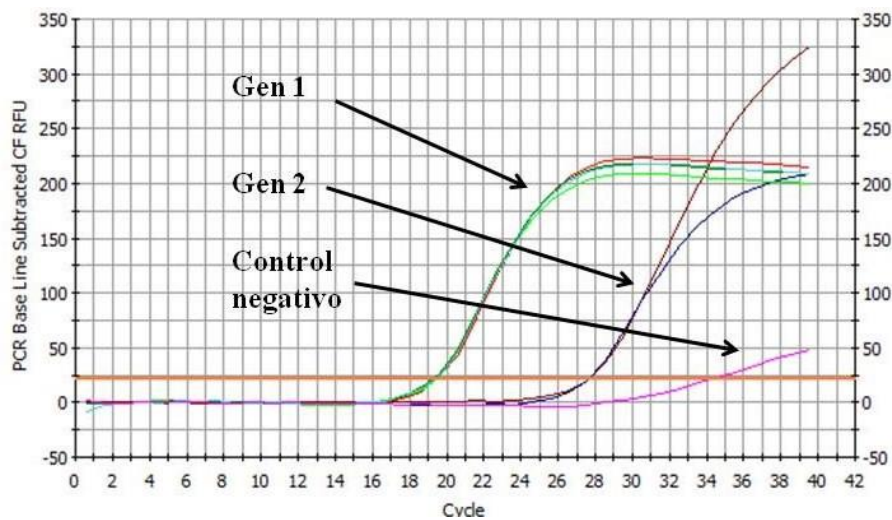
##### **2.8.4.1. Reacción de amplificación por PCR a partir de ADNc**

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 previamente a iniciar el experimento.

En primer lugar, se diseñó la distribución de las muestras en cada uno de los 96 pocillos de la placa de experimentación (*iQ™ 96-Well PCR Plates*, Bio-Rad). En cada placa, se incluyeron por triplicado tanto las muestras correspondientes al gen control constitutivo, que sirvieron para normalizar los datos obtenidos, 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 lo 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, como controles positivos y negativo, respectivamente. La amplificación de las muestras se llevó a cabo empleando el kit *SsoAdvanced<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix* (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso.

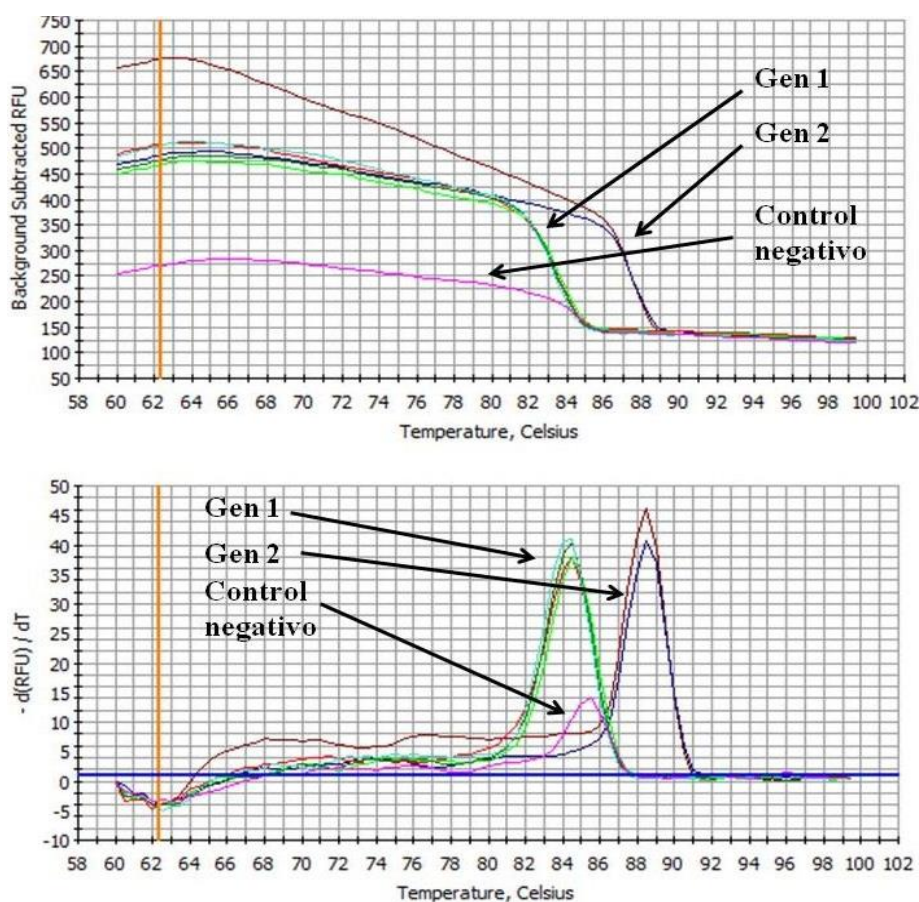
Para minimizar los errores por pipeteo, se preparó una mezcla madre para la reacción de PCR. A partir de ella, se repartieron con una pipeta multicanal 10 µl de reacción por muestra en cada uno de los pocillos, manteniendo el orden previamente establecido para cada muestra y evitando la formación de burbujas que impidieran una correcta detección de la fluorescencia emitida. Posteriormente, la placa se cubrió con una lámina transparente de plástico (*Microseal<sup>®</sup> '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 10).



**Figura 10.** 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.

### 2.8.4.2. 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 11A). 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 11B). También, fueron útiles para normalizar la reacción y eliminar el ruido de fondo de los dímeros de cebadores que, al tener menor tamaño, presentarán una temperatura de *melting* inferior a la del producto de PCR.



**Figura 11.** Curva de *melting* correspondiente a los amplicones generados por qRT-PCR en el sistema iCycler iQ system (Bio-Rad). Se muestran las curvas de fusión correspondientes a un gen problema (gen 1) y al gen espaciador 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.

### 2.8.5. 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.

#### 2.8.5.1 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 (Amil-Ruiz *et al.*, 2013). En general, la normalización se llevó a cabo según la siguiente fórmula (Pedersen, 2001).

$$\begin{aligned} \text{Incremento de la expresión} &= 2^{-\Delta(\Delta Ct)} \\ \text{donde } \Delta Ct &= Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo} \\ \text{y } \Delta(\Delta Ct) &= \Delta Ct \text{ gen inducido} - \Delta Ct \text{ control} \end{aligned}$$

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 los 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.

### 2.8.6. Generación y análisis de *microarray*

Las secuencias de ADNc contenidas en la librería del Dr. Kevin Folta (Universidad de Florida, Estados Unidos, 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 *Fragaria vesca* v1.0 (<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 nonámeros de Cy3 usando el kit de marcaje *NimbleGen One-Color DNA Labeling* y 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.

### **2.8.7. Estudios de RNA-Seq y análisis de genes diferencialmente expresados.**

En otras ocasiones, se llevaron a cabo estudios transcriptómicos masivos mediante ARN-seq, que en este estudio se realizaron siempre mediante la técnica Illumina. A diferencia de los microarray, que se basan en la hibridación de las poblaciones de ARN mensajero con oligos diseñados para cada gen, el ARN-seq es una tecnología basada en la secuenciación del ARN extraído. Para ello, una vez extraído el ARN se necesita elaborar una “librería” de ARN que contenga los transcritos extraídos. Debido a que los transcritos de ARN mensajero pueden tener longitudes que dificulten su secuenciación, el primer paso es romper las moléculas de ARN en otras más pequeñas, y que sean más fáciles de secuenciar. Debido a que en la secuenciación las primeras bases secuenciadas pueden contener fallos y con el objetivo de identificar las secuencias de cada librería, a estos fragmentos se les añade una secuencia conocida para, una vez secuenciados, poder identificar que ARN pertenece al organismo de estudio. La preparación de la librería y la secuenciación de la muestra se realizó por la empresa AllGenetics, A Coruña, España.

Brevemente, se usó el kit *Illumina TruSeq stranded mRNA library prep kit* para la preparación de las librerías, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit captura diferencialmente las poblaciones de ARNm mediante su cola poliA, con colas poliT unidas a bolitas magnéticas. El ARN mensajero capturado se convirtió en su ADN copia a los que se les añadió los adaptadores. Estos fragmentos se secuenciaron en un HiSeq-4000 de Illumina, obteniendo  $50 \pm 10$  millones de lecturas por librería que corresponden aproximadamente a una cobertura de 40 a 50 veces del genoma de *F. vesca*. La calidad de la secuenciación se analizó con FastQC, a las que se le eliminó los adaptadores y/o secuencias de mala calidad con Trimmomatic. Posteriormente, las secuencias obtenidas se mapearon contra la base de datos de *F. vesca*. La expresión diferencial entre los genes fue estudiada usando DE-Seq2. Para obtener los genes diferencialmente expresados se estableció un límite de  $\log_2$ Fold Change  $\geq 2$  y  $\leq -2$  y un valor estadístico  $p \leq 0.01$ .

### **2.8.8. Anotación de secuencias**

Se empleó el programa Blast2GO v2.7.2 para la anotación funcional de las secuencias usadas tanto en microarray como RNAseq, utilizando BLASTX con un valor de corte esperado de  $1.0E-10$  y su propia base de datos pública a fecha de septiembre de 2019 (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  $\pm 2$  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.

## 2.9. Generación de plantas transgénicas

### 2.9.1. Introducción a la metodología Gateway

La tecnología Gateway<sup>®</sup> es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades específicas de recombinación del bacteriófago  $\lambda$  (Landy, 1989). Este sistema utiliza una mezcla de enzimas de recombinación constituida por la *Integrasa* (*Int*), una *Excionasa* (*Xis*) y la proteína IHF (*Integration Host Factor*) codificada por *E. coli* para catalizar la reacción de recombinación LR clonasa Gateway<sup>®</sup> *in vitro* entre un *Entry vector* (pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>), 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.

Para optimizar al máximo el rendimiento de la recombinación LR, los vectores Gateway<sup>®</sup> contienen entre los dos sitios *att*, además de un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (CmR), el gen *ccdB* 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 $\alpha$ <sup>TM</sup>, TOP10) (Bernard y Couturier, 1992). Cuando se produce la recombinación LR entre el *Entry vector* 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.

### 2.9.2. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen<sup>TM</sup>)

El vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>) se empleó como *Entry vector* para el subclonaje de productos de PCR procedentes de la amplificación de una región previamente seleccionada del gen de interés. El subclonaje de los fragmentos generados por PCR dentro del vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> se realizó siempre siguiendo las indicaciones de la casa comercial. 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 (Apéndice 14) 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<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>.

<b>Apéndice 14: Poliadenilación</b>	
<b>Mezcla de reacción de poliadenilación</b>	<b>Programa utilizado</b>
10X PCR 5 µl Cl <sub>2</sub> Mg (50 mM) 1,5 µl dATP (2 mM) 1 µl DNA polimerasa 1 µl ADN 27 µl H <sub>2</sub> O 14,5 µl	72 °C, 30 min

Tras la poliadenilación, se procedió de nuevo a la purificación del producto de PCR obtenido con el kit *Thermo Fisher GenJET PCR Purification Kit* (Thermo) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez determinada la concentración del ADN recuperado mediante espectrofotometría, se procedió a su subclonaje dentro el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> utilizando la mezcla de reacción que se detalla en el *Apéndice 15* 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<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen<sup>TM</sup>) empleando 2-6 µl de la mezcla de reacción.

<b>Apéndice 15: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>(Invitrogen<sup>TM</sup>)</b>	
Amplicón purificado	2 µl
Solución salina (Invitrogen <sup>TM</sup> )	1 µl
H <sub>2</sub> O milli Q	2 µl
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen <sup>TM</sup> )	1 µl

### 2.9.2.1. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pFRN mediante la reacción LR clonasa Gateway (Invitrogen<sup>TM</sup>)

Una vez generados los *Entry vector* pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> 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<sup>TM</sup>). La recombinación se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción y adicionando los reactivos en el orden indicado:

<b>Apéndice 16: Mezcla de reacción LR Invitrogen<sup>TM</sup></b>	
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> ::inserto (300 ng)	x µl
pFRN (300ng)	1 µl
Tampón reacción LR [5X]	4 µl
LR Clonase enzyme mix	1 µl
Tampón TE pH8	hasta 16 µl



La mezcla se incubó a 25 °C durante 2-5 horas y, transcurrido este periodo, se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos en presencia de 2 µl de *proteínasa K*. A continuación, se procedió a la transformación de una alícuota de células competentes *One Shot*<sup>®</sup> TOP10 *Chemically Competent E. coli* (Invitrogen<sup>™</sup>) con 5 µl de la reacción LR como se describe en *Materiales y Métodos, apartado 2.3.2*.

### **2.9.3. 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 el genoma de las células vegetales. *A. tumefaciens* es una bacteria gram-negativa que produce la enfermedad de “agalla de corona” en un amplio rango de especies 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, produciendo proliferación celular en los tejidos infectados en forma de “tumores”. 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, 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, 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.

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).

#### **2.9.4. Transformación estable de plantas de *Fragaria* × *ananassa* “Chandler”**

##### **2.9.4.1. 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. Fernando 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 17*). 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).

##### **2.9.4.2. Transformación de plantas de *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” mediante infección con la cepa AGL1 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 mm<sup>2</sup>. Los explantos obtenidos se colocaron, siempre con el haz hacia abajo, en placas de Petri con medio de organogénesis (*Materiales y Métodos, apéndice 17*). 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* AGL1 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 kanamicina (50 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 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 DO<sub>600</sub> entre 0.6-1, los cultivos se diluyeron con medio MS hasta ajustar su DO<sub>600</sub> 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, 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 siempre y cuando no hubiera contaminación con *Agrobacterium*. 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, y por lo tanto una línea independiente.

### **2.9.4.3. Aclimatación y multiplicación de las plantas transgénicas**

Una vez multiplicadas *in vitro* para obtener un suficiente número de plantas, 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 a las condiciones ambientales 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-*FaMYB123* 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.

**Apéndice 17: 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*

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,47 g/l

KNO<sub>3</sub> 1,31 g/l

MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,24 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,13 g/l

KCl 0,074 g/l

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O 0,59 g/l

NaFe-EDTA 10 ml/l

(de una solución compuesta por:

3,724 g/l de Na<sub>2</sub>EDTA Titriplex

2,78 g/l de FeSO<sub>4</sub>)

*Micronutrientes*

Añadir 10 ml/l de una solución compuesta por:

MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O 1,690 g/l

ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,860 g/l

CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O 0,0025 g/l

KI 0,0830 g/l

CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O 0,0025 g/l

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,620 g/l

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O 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

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 H<sub>2</sub>O destilada. Los antibióticos se añadieron al medio estéril templado antes de solidificar. Posteriormente, éste se distribuyó en frascos previamente esterilizados.

**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

**2.9.4.4. 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.

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 2.8.2). En el caso del silenciamiento del gen *FaMYB123*, se seleccionaron aquellas líneas transgénicas que presentaron mayor grado de silenciamiento del gen, siempre por encima del 90%.

## **2.10. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta”**

### **2.10.1. 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 (Múnich, Alemania).

### **2.10.2. 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 a agroinfiltrar, 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 McConkey modificado (MMA) (Apéndice 18) (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.

**Apéndice 18: 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)

10 mmol l<sup>-1</sup> MES (ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico) a pH 5,6

20 g l<sup>-1</sup> de Sacarosa

200 µmol l<sup>-1</sup> de Acetosiringona

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, cuando alcanzaron el estadio rojo. En paralelo y de forma simultánea, también se inyectaron frutos con un cultivo de la cepa AGL0 de *A. tumefaciens* sin transformar usados como 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.

El grado de silenciamiento de los genes en estudio se determinó mediante qRT-PCR en los frutos transgénicos obtenidos en las diferentes transformaciones realizadas y de entre todos los frutos agroinfiltrados se seleccionaron aquellos que presentaron un grado de silenciamiento superior al 90% para un análisis transcriptómico detallado mediante microarray.

### **2.11. 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 1.3.2.*), 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 a estudiar fueron amplificadas por PCR usando cebadores específicos para cada gen con los sitios *attB1* y *attB2* acoplados. Tras la amplificación, se procedió a la purificación del producto de PCR obtenido empleando el *kit* comercial *Thermo Fisher GenJET PCR Purification Kit* (Thermo) y a su cuantificación por espectrofotometría. 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 1.3.2.*) utilizando la mezcla de reacción detallada en el Apéndice 17 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*<sup>®</sup>TOP10 *Chemically Competent E. coli* (Invitrogen<sup>™</sup>) con 2-6  $\mu$ l de la mezcla de reacción (*Materiales y Métodos, apartado 2.3.2*).

<b>Apéndice 19: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pDONR<sup>™</sup>221 (Invitrogen<sup>™</sup>)</b>	
Amplicón purificado (producto <i>attB-PCR</i> ) ~ 75 ng	1-7 $\mu$ l
pDONR <sup>™</sup> 221 (Invitrogen <sup>™</sup> ) (150 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Tampón TE pH 8	hasta 10 $\mu$ l
<i>BP clonase enzyme mixII</i>	2 $\mu$ l

Una vez generado el *Entry vector* pDONR<sup>™</sup>221 conteniendo independientemente el fragmento de ADNc correspondiente a los genes a estudiar, se procedió a su transferencia al vector binario pK7WGF2.0 mediante la recombinación mediada por la *LR clonasa Gateway* (Invitrogen<sup>™</sup>). 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:

<b>Apéndice 20: Mezcla de reacción LR Invitrogen<sup>™</sup></b>	
pDONR <sup>™</sup> 221-ADNc (300 ng)	x $\mu$ l
pK7WGF2.0 (300ng)	1 $\mu$ l
Tampón reacción LR [5X]	4 $\mu$ l
LR <i>Clonase enzyme mix</i>	1 $\mu$ l
Tampón TE pH8	hasta 16 $\mu$ l

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  $\mu$ l de *proteínasa K*. A continuación, se procedió a la transformación con 5  $\mu$ l del total de la reacción de una alícuota de células competentes *One Library Efficiency DH5 $\alpha$  Chemically Competent Cells* (Invitrogen<sup>™</sup>) como se describe en *Materiales y métodos, apartado 2.3.2*. Posteriormente, se seleccionaron transformantes bacterianos positivos por PCR y se extrajo el vector usando el kit *GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo).

Las construcciones generadas fueron testadas mediante secuenciación (*Materiales y Métodos, apartado 2.5.6*) 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-*gen* y el vector vacío pK7WGF2 (usado como control); y cultivos de *A. tumefaciens* 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<sub>600</sub>~ 0,8. Las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en tampón de infiltración (10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MES y 1 mM acetosiringona) ajustando su concentración final a una DO<sub>600</sub> 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 al ADN y su alta permeabilidad permite la tinción de núcleos celulares con poco ruido de fondo del citoplasma.

## 2.12. Interacción mediante doble híbrido en levadura

En el estudio de doble híbrido de levadura, el marco abierto de lectura de los genes *FaMYB123*, *FaEOBII*, *FabHLH3*, *FaMYB9* y *FaMYB10*, subclonados en el vector pDONR<sup>TM</sup>221, fueron recombinados mediante reacción LR Gateway<sup>TM</sup> en los vectores “bait” pBDGAL4 (pDEST<sup>TM</sup>32; Invitrogen<sup>TM</sup>), y “prey” pADGAL4 (pDEST<sup>TM</sup>22; Invitrogen<sup>TM</sup>), independientemente (*Materiales y Métodos. Apartado 1.3.1*) (cedidos por cortesía del Dr. Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, Países Bajos). 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 2.4.2*) en ausencia de triptófano y leucina, respectivamente, y comprobadas por PCR con cebadores específicos.

### 2.12.1. 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 auto-activaciones, mientras que las verdaderas interacciones siguen siendo detectables.

## **2.13. Tratamientos hormonales en frutos y plantas**

### **2.13.1. Retirada de achenios 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, a la retirada cuidadosa de los achenios en frutos de estadio de desarrollo V2 usando un bisturí. Posteriormente, se aplicó sobre un grupo de estos frutos desaquenizados una pasta de lanolina (preparada al 50% en H<sub>2</sub>O 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) 1 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.

### **2.13.2. Tratamiento con NDGA**

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  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 2.13.3. Tratamiento de estrés hídrico

Debido a que las condiciones de estrés hídrico aumentan las concentraciones de ABA, en 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 17) 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $25^{\circ}\text{C}$ , 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 (Múnich, Alemania). 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  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de su ARN.

### 2.13.4. Tratamiento con 5-azacitidina

Para el tratamiento con 5-azacitidina en frutos, se preparó una disolución a una concentración de 1mM en agua estéril. La solución se esterilizó usando filtros de  $0.22\ \mu\text{m}$  de poro. Aproximadamente 0.5 ml de la solución se inyectó a frutos en estadio V3-B usando una aguja de HPLC. La aguja se introdujo entre 0.3 a 0.5 cm y una única vez para evitar daño excesivo al fruto. Solo la mitad del fruto fue inyectada con 5-AZA, mientras que la otra mitad recibió la misma cantidad de agua como control. El tratamiento se repitió cada 3 días hasta un total de 3 a 5 veces hasta que la parte control madurase normalmente. Una vez la parte control llegase al estadio rojo, ambas partes se separaron con un bisturí y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **2.13.5. Tratamientos con giberelinas y paclobutrazol**

Se inyectaron frutos de fresa (*Fragaria × ananassa*) en estadio verde-2 con paclobutrazol (PAC) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). El PAC es un triazol que retarda el crecimiento vegetal debido a que interfiere, bloqueando la síntesis de giberelinas. Los frutos de fresa seleccionados para el experimento fueron inyectados con 1-2 ml de PAC 100 µM, GA<sub>3</sub> 100 µM y agua destilada en el caso de los frutos control. En todos los tratamientos, se añadió a la solución inyectada 0,02 % Tween20 y 0,1 % N-dimetilformamida para facilitar la difusión de la solución inyectada a través de las paredes celulares. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones. Los frutos tratados fueron cosechados tras 24 horas de experimentación y empleados para la extracción de ARN. Para ello, los frutos recolectados fueron congelados con nitrógeno líquido inmediatamente y almacenados a -80 °C hasta su uso.

Para los experimentos con plantas, se emplearon plantas de fresa (*Fragaria × ananassa* “Chandler”) mantenidas en cultivo in vitro. Las plantas fueron tratadas de forma independiente con GA<sub>3</sub> 100 µM y PAC 100 µM y se mantuvieron en la cámara de crecimiento durante 11 días antes de su recolección. Tres grupos de dos plantas cada uno fueron empleadas en cada tratamiento y fueron comparadas con plantas control no tratadas.

## **2.14. Extracción de metabolitos y hormonas del fruto de fresa**

### **2.14.1. Extracción de metabolitos**

La extracción de metabolitos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lisec *et al.*, 2006. En resumen, aproximadamente 100 mg de tejido fresco liofilizado se homogeneizó con 300 µL de metanol al 50 % a 70 °C durante 30 minutos con agitación continua a 900rpm. Posteriormente, se añadieron 200 µL de cloroformo y 300 µL de agua. Tras una centrifugación para separar las fases, la fracción polar se evaporó en un *speed-vaccum*. Se tomaron 2 alícuotas de la fracción polar, una de 100 µL que se usó para la determinación de compuestos por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), y otra de 350 µL que fue usada para cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

#### **2.14.1.1. Análisis de productos por GC-MS**

La fracción polar usada para el análisis por GC/MS fue derivatizada en 40 µL de metoxamina hidrocloreto (20 mg ml<sup>-1</sup>) disuelta en pirimidina. La mezcla fue incubada 30 minutos a 37°C con agitación continua a 900 rpm. Posteriormente, se añadieron 70 µL de MSTFA y todo se incubó durante 45 minutos a 37°C con agitación continua a 900rpm. 1 µL de la mezcla fue inyectado en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas *time-of-flight* (GC-

MS, Leco Pegasus HT TOF-MS (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). El gas usado como *carrier* fue helio, usando un ritmo constante de 2 ml/s. La cromatografía se realizó en una columna DB-35 de 30 m. La temperatura de inyección fue 230 °C y la de los iones de 250 °C. La temperatura inicial del horno se estableció a 85 °C y fue aumentando gradualmente 15 °C /min hasta alcanzar una temperatura final de 360 °C. Los tres primeros minutos del cromatograma fueron desechados y, a partir de ese momento, se tomaron 20 medidas por segundo en un rango de 70-600 m/z. Los espectros de masa se analizaron usando Chroma TOF 4.5 (Leco) y TagFinder 4.2. Los compuestos fueron identificados mediante comparación con los espectros de masa depositados en las bases de datos correspondientes y empleando la bibliografía publicada.

#### **2.14.1.2. Análisis de productos por LC-MS**

La fracción polar restante fue disuelta en 200 µL de metanol 50% e inyectada en un detector Orbitrap según lo descrito por Giavalisco *et al.*, (2009). El sistema HPLC se equipó con una columna de fase reversa HSS T3 C18 (100 × 2.1 mm i.d., 1.8-µm filtro, Waters) que fue operado a una temperatura de 40 °C. La fase móvil consistió en dos fases: 0.1% de ácido fórmico en agua (Solvente A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (Solvente B). Se inyectó 2 µL de muestra a un ritmo de solvente de 400 µL/min. El HPLC se conectó a un espectrómetro de masas Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). El espectro de masas se determinó tanto en modo positivo como negativo en un rango de masas 100 a 1500 m/z. La resolución se determinó en 25.000 y el tiempo máximo de escaneo en 250 ms. El espectro se recogió desde el minuto 0 al 20 en ambos modos. El espectro de masas y tiempo de retención se extrajo usando RefinerMS 5.3, Gene data y Xcalibur (Thermo Fisher). La identificación de los compuestos se realizó mediante el uso de compuestos estándares previamente identificados y descritos en la bibliografía sobre fresa.

#### **2.14.1.3. 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 2.16*).

#### **2.14.2. 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 [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA fue evaluada mediante HPLC en las condiciones indicadas a continuación.

En la extracción de ABA se empleó 1 g de fruto de fresa que fue homogenizado en N<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>) 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 Triple Quadrupole). 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<sup>-1</sup>. La MS constó de un sistema SIM (Selecting Ion Monitoring) y el flujo de N<sub>2</sub> 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 Data Analysis (Bruker Daltonics).

### 2.14.3. Extracción y análisis de hormonas

Aproximadamente 200 mg de tejido fresco y posteriormente liofilizado se usaron para la identificación de hormonas, según lo publicado por Plackett *et al.*, 2012. El tejido se incubó con 10 mL de 80% acetonitrilo conteniendo 1% de ácido acético durante 1 hora a 4 °C en movimiento continuo. Después de centrifugar a 3000g durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y el residuo se extrajo de nuevo con la misma mezcla. Se mezclaron ambos sobrenadantes y se evaporó en un *speed-vaccum*. El residuo se disolvió en 2mL de 1% ácido acético y fue sonificado en un baño durante 5 minutos. Tras una centrifugación, el sobrenadante se añadió en una columna OASIS HLB (60mg, 3cc Waters), posteriormente se lavó con 3ml de acetonitrilo, metanol y 1% de ácido acético. Las hormonas fueron eluidas de la columna con dos lavados consecutivos de 3mL de una solución 80% acetonitrilo-1% ácido acético. Posteriormente añadieron a la columna SepPak (100mg, Waters), previamente lavada con metanol y 0.1M de HCl. El extracto fue añadido en una columna MCX, eluido con acetonitrilo y evaporado en un *speed-vaccum*. El residuo se resuspendió en 700 µL de ácido acético al 1% y añadido en una columna Wash WAC solid-phase, previamente lavada con metanol, 0.1M NaOH y agua. Las hormonas se eluyeron con 80% acetonitrilo conteniendo 1% ácido acético. El eluido se evaporó en un *speed-vaccum* y posteriormente se disolvió en 30 µL de 1% ácido acético. El contenido de las diferentes hormonas se determinó mediante HPLC asociado a un espectrómetro de masas triple quad, siguiendo lo descrito por Salem *et al.*, 2020.

## 2.15. Extracción de proteínas y análisis enzimáticos

### 2.15.1. Extracción de proteínas

El fragmento correspondiente a la región codificante de la proteína FaCXE se amplificó mediante PCR usando oligos específicos para el inicio y final de la secuencia a los que se le añadió la secuencia de reconocimiento de las enzimas EcoRI y XhoI en los extremos 5' y 3'. El fragmento de PCR fue purificado y clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega). Posteriormente, usando ambos sitios, el fragmento se introdujo en el vector pGEX-4T-1 (Amersham), transformado en *E. coli*.

Para la expresión de la proteína recombinante, se incubaron células transformadas de *E. coli* con los antibióticos apropiados hasta una densidad óptica  $OD_{600} = 0.6$ , se llevó a una temperatura de 16°C e induciendo la proteína con 1 mM IPTG. Después de añadir el IPTG, el cultivo se dejó durante 12 horas a 16°C y posteriormente las células se recogieron por centrifugación y el precipitado se congeló a -80 °C durante al menos 15 minutos. Posteriormente, las células recogidas se resuspendieron en 10 mL de una solución de lavado fría (4.3 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.47 mM  $KH_2PO_4$ , 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) y fueron sonicadas en

frio al menos 3 veces durante 30s usando un sonicador Sonopuls GM 2017, Bandelin al 10% del total de su potencia. Las células sonicadas se centrifugaron a 4 °C, 10.000g durante 20 minutos. La fracción soluble se incubó en una columna Telos™ SPE Columns con GST-sepharosa durante al menos 1hr a 4°C. La proteína unida a la columna se lavó con la solución de lavado y se separó de la columna usando tampón de elución (50 mM TRIS-HCl, 1 mM glutathione, pH 8). La proteína eluída se cuantificó usando el reactivo de Bradford y analizada en gel SDS-PAGE.

### **2.15.2. Análisis enzimático y cinético de la proteína recombinante FaCXE**

La actividad enzimática esterasa se determinó, según el método de Gomori, 1953 según lo modificado por van Asperen, 1962. La mezcla de reacción consiste en 5mL de 0.3mM de 1-naftil acetato y de 50 a 100 µg de enzima, incubado a 27 °C por 15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL del reactivo DBLS (2 partes de 1% diazo blue B y 5 partes 5% SDS). El producto de la reacción se determinó mediante absorbancia a 600nm. Una unidad de actividad enzimática se determina como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de producto por minuto a pH 7 y 27 °C. Una vez determinada estas condiciones, se estudió el efecto sobre la actividad enzimática al cambiar diferentes variables.

#### **2.15.2.1. Efecto del tiempo**

La enzima purificada se incubó con naftil-acetato durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a 27 grados. La reacción se preparó según lo descrito anteriormente y se incubó de la misma manera. La cantidad de naftol liberado en cada tiempo se determinó usando una recta patrón.

#### **2.15.2.2. Concentración de enzima**

La reacción previamente descrita se llevó a cabo usando 25, 50, 75, 100, 125 y 150 µg de proteína purificada. La cantidad de naftol liberado en cada tiempo se determinó usando una recta patrón.

#### **2.15.2.3. Especificidad de sustrato**

La especificidad de sustrato se determinó usando naftil acetato, naftil butirato y naftil hexanoato como sustrato. La reacción se llevó a cabo según lo descrito anteriormente para cada uno de los sustratos a estudiar. La reacción para cada uno de los sustratos se incubó durante 15 minutos a la temperatura óptima. Después de detener la reacción, la intensidad del color formado se determinó por espectrofotometría a 600nm.



#### 2.15.2.4. Efecto del pH y la temperatura

El efecto del pH en la actividad de la enzima se determinó usando 3 tampones diferentes. i) Citrato sódico (0.05M, pH 3.0–6.0) ii) fosfato sódico (0.05 M, pH 6.0–8.0), iii) Tris-HCl (0.05 M, pH 8.0–10.0). La actividad enzimática se determinó usando naftil acetato como sustrato, mientras que las condiciones de la reacción fueron 15 minutos a 27 °C. La cantidad de naftol producido se determinó mediante espectrofotometría a 600nm.

Para estudiar el efecto de la temperatura, la proteína recombinante purificada se incubó a diferentes temperaturas en el rango entre 10 °C a 50 °C. La reacción se llevó a cabo usando naftil acetato como sustrato e incubada durante 60 minutos. La cantidad de naftol producido se determinó mediante espectrofotometría a 600nm.

#### 2.15.2.5. Km y Vmax

Una vez determinado las condiciones óptimas para la reacción, la enzima se incubó con diferentes concentraciones de naftil acetato, naftil butirato y naftil hexanoato durante 20 minutos, según lo descrito previamente. La concentración de naftol formado se determinó por espectrofotometría y se calculó la Km y Vmax para cada reacción.

#### 2.16. 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 una prueba “t de Student” donde los valores estadísticos de significación fueron \**P-value* ≤ 0.05, \*\**P-value* ≤ 0.01 y \*\*\**P-value* ≤ 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  $p < 0.05$ .

## Bibliografía

- Amil-Ruiz F, Garrido-Gala J, Blanco-Portales R, Folta KM, Muñoz-Blanco J, Caballero JL.** 2013. Identification and validation of reference genes for transcript normalization in strawberry (*Fragaria x ananassa*) defense responses. *Plos One* **8**: e70603.
- 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.
- Barceló M, El Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, 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, 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 KE, Melderen LV, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, 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 x 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 *Biochemistry* **72**: 248– 254.
- Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J.** 2001. *Introducción a la biotecnología vegetal. Métodos y aplicaciones*. Publicaciones de la Obra Social y Cultural de Cajasur, Córdoba.
- Christie PJ.** 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 RA, Bell E, Mullet JE.** 1992. Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **99**:1258-1260.
- de Folter, 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 GA, González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal Biotechnology* **1**: 1-16.
- El Mansouri L, Mercadi JA, Valpuesta V, López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA.** 1996. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* **15**: 642–646.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I.** 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemistry* **19**: 520-525.

- Gelvin SB.** 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 16-37.
- George EF.** 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd. Edington. England.
- Giavalisco P, Köhl K, Hummel J, Seiwert B, Willmitzer L.** 2009. <sup>13</sup>C isotope labeled metabolomes allowing for improved compound annotation and relative quantification in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic research. *Annal of Chemistry* **81**: 6546-6551.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoot RA.** 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 PJJ, Beijersbergen A.** 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 157-179.
- Horobin RW.** 1988. Understanding histochemistry: selection, evaluation and design of biological stains. *E. Horwood*, 172p.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann N, Wallroth M, Eichholz D, Rogers SG, Fraley RT.** 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 EA.** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A.** 2002. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-195.
- Koncz C, Schell J.** 1986. The promoter T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric 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 GR, Pascal AS, Ludwig RA.** 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**: 963-967.
- Liu ZR, Sanford JC.** 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *HortScience* **23**: 1057-1059.
- Liseč J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR.** 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387–396.
- López-Aranda JM, 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 behavior of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal of Horticultural Science* **69**: 625-637.
- Mancinelli AL, Schwartz OM.** 1984. The photoregulation of anthocyanin synthesis. *Plant Cell Physiology* **25**: 93-105.

- Murashige T, Skoog F.** 1962. Aided medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Plackett ARG, Powers SJ, Fernández-García N, Urbanova T, Takebayashi Y, Seo M, Jikumaru Y, Benloch R, Nilsson O, Ruiz-Rivero O, Phillips AL, Wilson ZA, Thomas SG, Hedden P.** 2012. Analysis of the developmental roles of the arabidopsis gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *The Plant Cell* **24**: 941-960.
- Pedersen SB.** 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 AL.** 1986. Light, temperature and anthocyanin production. *Plant Physiology* **81**: 922-924.
- Raviv M, Reuveni O, Goldschmidt EE.** 1987. The physiological basis for loss of root ability with age in avocado seedlings. *Tree Physiology* **3**: 115-122.
- Rock CD, Zeevaart JAD.** 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.
- Salem MA, Yoshida T, Perez de Souza L, Alseeekh S, Bajdzienko K, Fernie AR, Giavalisco P.** 2020. An improved extraction method enables the comprehensive analysis of lipids, proteins, metabolites and phytohormones from a single sample of leaf tissue under water-deficit stress. *The Plant Journal*. **103**:1614-1632.
- 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.

**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*.

**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**:1579-1588.



## **CHAPTER 1**

**An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle**

**This chapter has been published as**

Medina-Puche L\*, **Martínez-Rivas FJ\***, Molina-Hidalgo FJ\*, Mercado JA, Moyano E, Rodríguez-Franco A, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R. 2019. An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle. *BMC Plant Biology* **19**: 586.

\*These authors contribute equally to this work.



## **An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle**

### **Abstract**

In soft fruits, the differential expression of many genes during development and ripening is responsible for changing their organoleptic properties. In strawberry fruit, although some genes involved in the metabolic regulation of the ripening process have been functionally characterized, some of the most studied genes correspond to transcription factors. High throughput transcriptomics analyses performed in strawberry red receptacle (*Fragaria x ananassa*) allowed us to identify a ripening-related gene that codes an atypical HLH (*FaPRE1*) with high sequence homology with the PACLOBUTRAZOL RESISTANCE (PRE) genes. PRE genes are atypical bHLH proteins characterized by the lack of a DNA-binding domain and whose function has been linked to the regulation of cell elongation processes. *FaPRE1* sequence analysis indicates that this gene belongs to the subfamily of atypical bHLHs that also includes *ILI-1* from rice, *SIPRE2* from tomato and *AtPRE1* from *Arabidopsis*, which are involved in transcriptional regulatory processes as repressors, through the blockage by heterodimerization of bHLH transcription factors. *FaPRE1* presented a transcriptional model characteristic of a ripening-related gene with receptacle-specific expression, being repressed by auxins and activated by abscisic acid (ABA). However, its expression was not affected by gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). On the other hand, the transitory silencing of *FaPRE1* transcription by agroinfiltration in receptacle produced the down-regulation of a group of genes related to the ripening process while inducing the transcription of genes involved in receptacle growth and development. In summary, this work presents for the first-time experimental data that support an important novel function for the atypical HLH *FaPRE1* during the strawberry fruit ripening. We hypothesize that *FaPRE1* modulates antagonistically the transcription of genes related to both receptacle growth and ripening. Thus, *FaPRE1* would repress the expression of receptacle growth promoting genes in the ripened receptacle, while it would activate the expression of those genes related to the receptacle ripening process.

### **Introduction**

During the processes of development and ripening of soft fruits, many metabolic pathways that are responsible for organoleptic properties are differentially expressed. In strawberry fruits, it is very well established that the increase in the ABA/auxins ratio triggers the transcription of many ripening-related genes involving the different organoleptic properties such as aroma, color, taste and softening (Koyama *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2014; Molina-Hidalgo *et al.*, 2015). However, except for

some transcriptional factors (TFs), the functional characterization of genes involved in the regulation of these metabolic pathway is very scarce until now. Thus, it has been described the function played by a few transcription factors. *FaMYB10*, a R2R3 MYB TF related to the secondary metabolism, is described as a ripening-related master regulatory gene of the structural flavonoid/phenylpropanoid metabolic pathway genes (Medina-Puche *et al.*, 2014); and the *EMISSION OF BENZENOIDS II (FaEOBII)*, a positive regulator of flavonoids/phenylpropanoids volatile-related genes, regulates the *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (FaCAD1)* and the *EUGENOL SYNTHASE 2 (FaEGS2)*, which controls the production of eugenol, a volatile phenylpropanoid, in ripe strawberry receptacles (Medina-Puche *et al.*, 2015). Recently, a DOF-type TF (FaDOF2) has also been identified as a positive regulator of eugenol biosynthesis in ripened strawberry receptacle. Both FaEOBII and FaDOF2 seem to act synergistically in the activation of the *FaEGS2* gene transcription (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017). In this way, an ERF-MYB TF complex regulates furaneol biosynthesis by means of a quinone reductase transcription regulation (Zhang *et al.*, 2018).

The functional role played by FcMYB1, another R2R3 MYB TF, was also characterized. This TF acts as regulator of the branching point of the anthocyanins/proanthocyanidins biosynthesis (Salvatierra *et al.*, 2013). Also, *FaGAMYB* has been described as a regulator in the transition from vegetative growth to ripening process (Vallarino *et al.*, 2015). In addition, it was demonstrated that the transient down-regulation of the C-type MADS-box TF expression (*SHATTERPROOF-like* gene; *FaSHP*) gave rise to a slightly shorter delay in the time required to reach the pink stage of ripening (Daminato *et al.*, 2013). Besides, transcription of several ripening-related genes as well as the content of several metabolites was altered in these transiently modified fruits (Daminato *et al.*, 2013). It was proposed that SCARECROW-LIKE 8 (FaSCL8) could modulate the transcription regulation of genes related to the flavonoid/anthocyanin biosynthesis, probably through their influence on *FaMYB10* gene expression (Pillet *et al.*, 2015). Moreover, *FaMYB44.2* has been proposed to interact with *FaMYB10* in sucrose accumulation, which would have an impact on the ripening process. (Wei *et al.*, 2018) On the other hand, four TFs (FaMYB9/FaMYB11, FabHLH3 and FaTTG1) have been described as positive activators of genes that are involved in the proanthocyanidins (PAs) biosynthesis in strawberry immature fruits (Schaart *et al.*, 2013). A comparison between a mutant whited coloured strawberry and a red natural one has discovered some TF potentially involved in the anthocyanin biosynthesis (Zhao *et al.*, 2018).

High throughput transcriptomics analyses previously performed by our group (Medina-Puche *et al.*, 2016) have allowed us to identify a ripening-related gene that codes an atypical HLH (*FaPRE1*) belonging to the basic helix-loop-helix/helix-loop-helix (bHLH/HLH) TFs family.

*FaPRE1* was selected for its expression characteristics: a) ripening-related; b) receptacle-specific; c) negatively regulated by auxins, and d) induced by ABA (Medina-Puche *et al.*, 2016). According to their DNA-binding ability, these proteins are classified into two groups; DNA-binding bHLH (bHLH) and non-DNA-binding bHLH (HLH) proteins, also called atypical HLH (Lee *et al.*, 2006; Roig-Villanova *et al.*, 2007; Carretero-Paulet *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018; Wei and Chen, 2018). bHLH TFs contain two clearly differentiated domains, a basic domain located at the amino terminus of the proteins, which contains 13-17 basic amino acids, and an HLH region, located at the carboxy terminus that comprises two amphipathic  $\alpha$ -helices which are rich in hydrophobic amino acids and are connected by a loop of variable length. The basic domain gives the transcription factor the ability to bind to the DNA (Massari and Murre, 2000; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Wei and Chen, 2018) while the presence of the HLH motif confers the ability to establish homo- or heterodimeric interactions with other bHLH proteins, which is essential for DNA recognition and DNA-binding specificity (Carretero-Paulet *et al.*, 2010; Wei and Chen, 2018).

On the contrary, HLH proteins are particularly diverged at the basic region, that usually lacked critical sequences for a proper DNA binding domain and, in consequence, they did not present DNA-binding ability (Massari and Murre, 2000). HLH proteins may dimerize with other bHLH proteins (Herold *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2007; Wei and Chen, 2018; Shin *et al.*, 2019), thus acting as negative regulators of bHLH protein action through the formation of heterodimers. This interaction will avoid bHLH protein to interact with other bHLH and, in this way, with their corresponding *cis* sequences on the DNA (Castelain *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013; Wei and Chen, 2018; Shin *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019).

Several studies have shown that atypical HLH proteins play important regulatory roles in hormone signaling and cell elongation (Hyun and Lee, 2006; Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2014), light signaling (Wang *et al.*, 2009), vascular and fruit development (Castelain *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2019) or grain size (Heang and Sassa, 2012a; Jang *et al.*, 2017). In this sense, functional analysis identified *AtPRE1* (*Arabidopsis* PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 1), an atypical HLH protein that plays an activator role of genes that respond to gibberellin, presumably downstream of DELLA proteins (Lee *et al.*, 2006). *AtPRE1* also regulates organ elongation in response to BRs (Ikeda *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013). Thus, *AtPRE1* interacts with IBH1 (ILI1 binding bHLH 1), another atypical HLH that negatively regulates ACE1 (Activator of Cell Elongation 1). When *AtPRE1* interacts with IBH1, it prevents its binding to ACE1 and restores the transcription ability of ACE to induce cell elongation (Ikeda

*et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013). Thus, this triantagonistic bHLH system, which is generally used for these transcriptional regulators to perform its function, seems to be important in determining the final size of plant cells (Ikeda *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013).

Furthermore, in tomato, the *PRE*-like gene *SlStyle2.1* control both the elongation and length of floral style and has also been related to the evolution of self-pollination flowers in cultivated varieties (Chen *et al.*, 2007). In all these cases, the balance of triantagonistic bHLH proteins might be important to determine both the size of plant cells and the regulation of cell elongation, acting downstream of multiple external and endogenous signals (Bai *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013). Very little is known about the role of bHLH/HLH regulators in fruit ripening. In fruits, only an atypical HLH has been described in tomato (*SIPRE2*) that seems to participate in the development of the immature fruit but not in the stages of fruit ripening (Zhu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019). This transcriptional factor is predominantly expressed in the fruit development and the silencing of its transcription diminished fruit size due to a thinning of the fruit pericarp (Zhu *et al.*, 2019). Furthermore, *SIPRE2* transcription was GA<sub>3</sub>-inducible in immature green fruits. The authors suggest that *SIPRE2* may regulate fruit size through the regulation of the cell expansion (Zhu *et al.*, 2019).

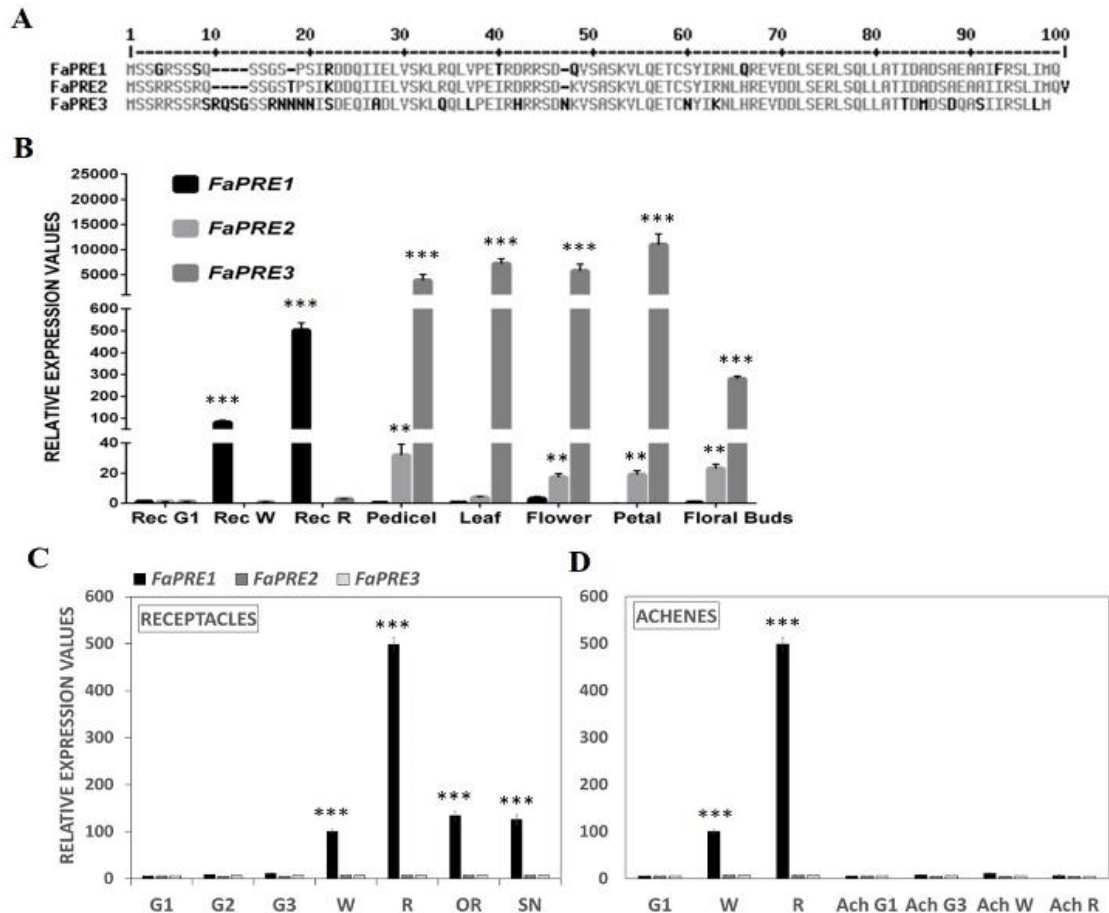
However, the specific role played by the bHLH/HLH in the fruit ripening process is not known. In this paper, we present the functional characterization, along the ripening of the strawberry receptacle, of an atypical HLH protein (*FaPRE1*). The transcription pattern of this gene is receptacle specific and clearly inducible along the ripening stages. In addition, the *FaPRE1* transcription is regulated positively for the internal concentration of abscisic acid (ABA) in the receptacle but not for the content of GA<sub>3</sub>. The transitory silencing of *FaPRE1* transcription by agroinfiltration in receptacle produced the down-regulation of a group of genes related to the ripening process while it induced the transcription of genes involved in receptacle growth. All these results indicate that *FaPRE1* plays a novel and important pivotal functional role along the receptacle ripening process differentially coordinating the antagonistic transcription of genes related to the receptacle growth and of those genes involved in receptacle ripening.

## Results

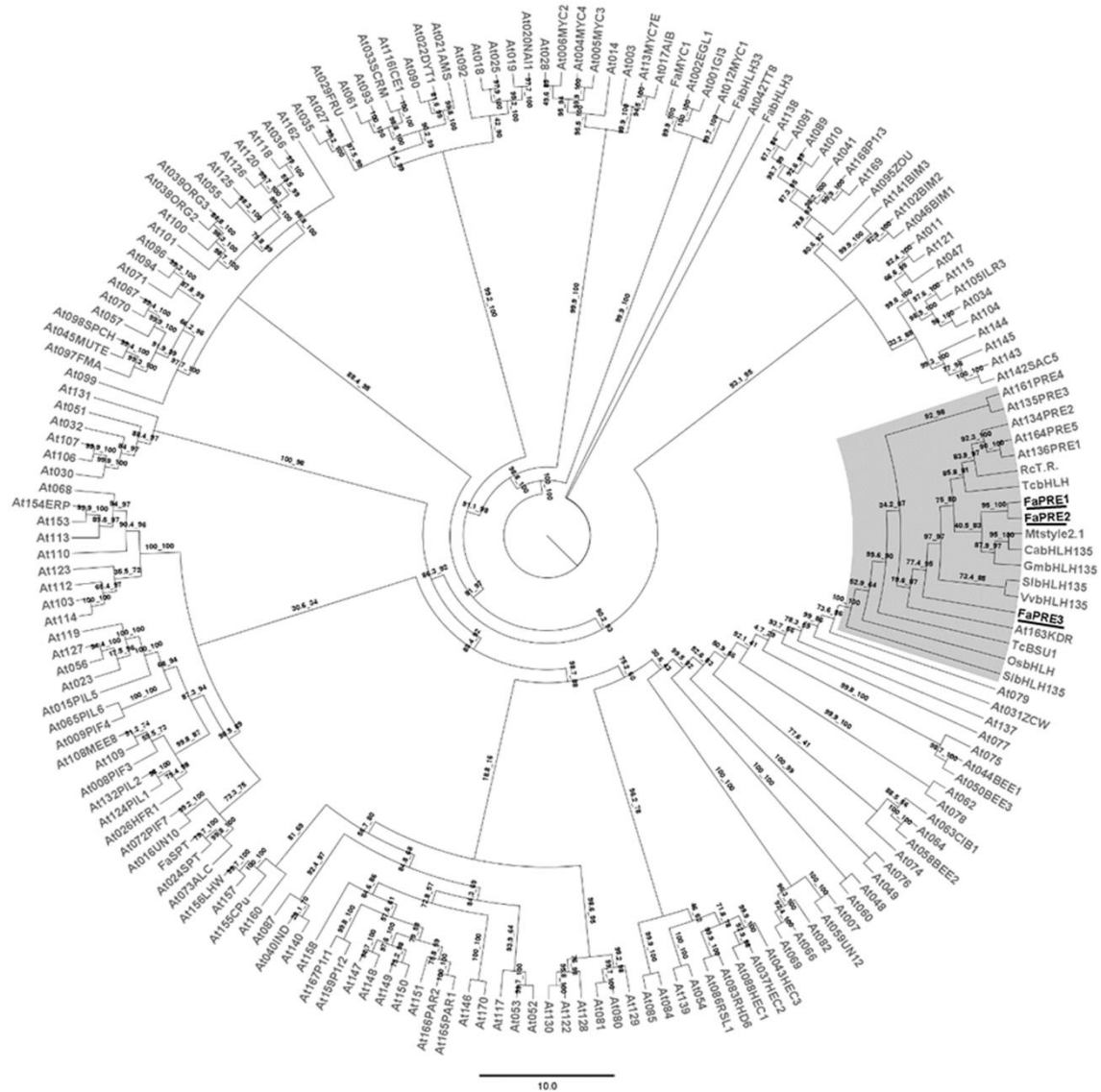
### ***FaPRE* genes encode atypical HLH proteins**

Bioinformatics analysis of the available *Fragaria vesca* (v2.0.a2) (Li *et al.*, 2017) and *Fragaria x ananassa* genome (v1.0-a1) (Edger *et al.*, 2019) has allowed us to identify three *PRE* genes (*FaPRE*) in strawberry genome that we have named *FaPRE1* (*gene30478*), *FaPRE2* (*gene28320*) and *FaPRE3* (*gene03986*). The comparison of the deduced proteins from *FaPRE* genes had a 90% amino acid sequence identity among them (Fig. 1A). Phylogenetic analysis

showed that FaPRE1, FaPRE2 and FaPRE3 proteins can be classified into the atypical HLH subgroup 16 of the 32 plant bHLH/HLH subfamilies (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) (Fig 2, Additional file 1).



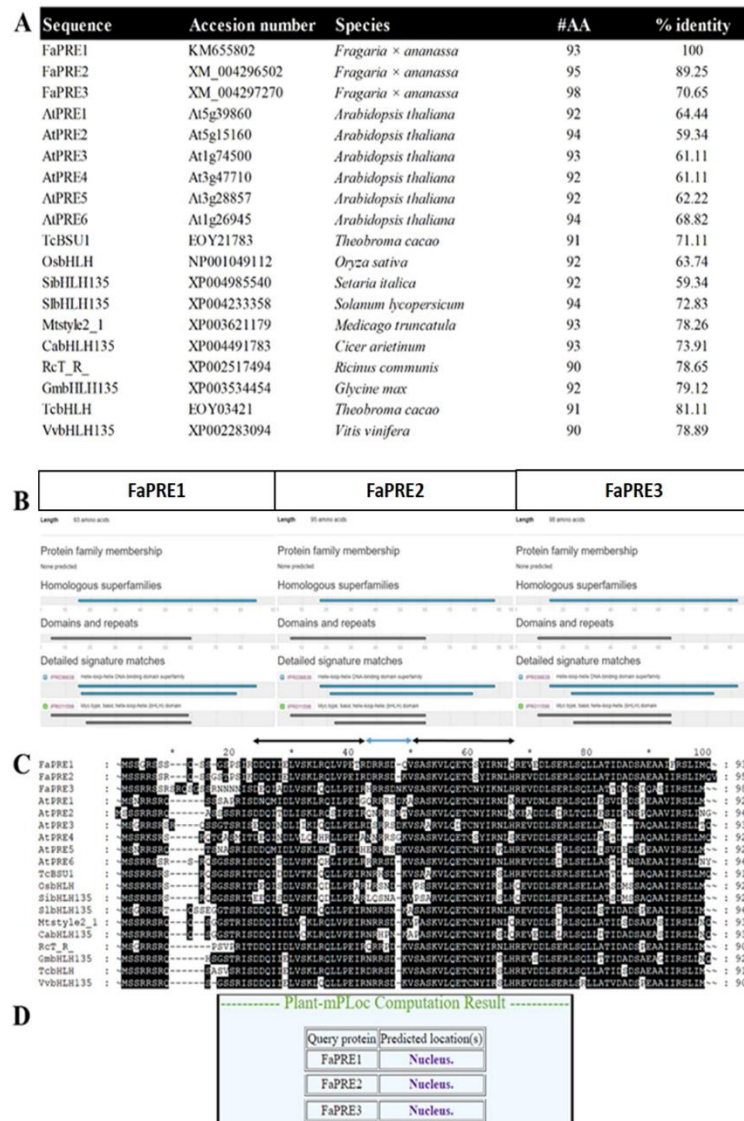
**Fig 1.** **A** Alignment of the predicted amino acid sequences of FaPRE1, FaPRE2 and FaPRE3 proteins. **b-d** Analysis by qRT-PCR of FaPRE genes expression in different tissues of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” plants. **B** Analysis of FaPRE genes expression in some selected developing receptacles compared with vegetative tissues. Analysis of FaPRE genes expression in receptacles (**C**) and achenes (**D**) in different stages of development. Rec G1 and G1, small-sized green fruit; G2, middle-sized green fruits; G3, full-sized green fruit (G1 and G3: stages of development); Rec W and W, white stage; Rec R and R, ripe stage; OR, overripe stage; SN, senescent stage. Results were obtained using 3’UTR specific primers and quantification is based on Ct values. Relative expression values were calculated relative to receptacles G1 stage Ct value, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. Statistical significance with respect to the reference sample was determined by the Student’s t-test: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig 2.** Phylogenetic tree of 184 bHLH/HLH transcription factors. FaPREs taxa is written in black and grey clade contains sequences belonging to subgroup 16. The tree was constructed using the IQTREE web software (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) by the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates.

In addition, the analysis of the FaPREs amino acid deduced sequence with InterProScan software revealed that, as in other similar PRE-like proteins, FaPREs lack the basic region at the amino terminal end of the protein which is characteristic of the bHLH transcription factors and responsible for their specific DNA binding ability. The atypical HLHs interact with bHLHs transcription factors and, in this way, interfere with their regulatory activity by blocking its binding to the *cis*-regulatory sequences positioned on the gene promoters that regulate. In this sense, the existence of a putative helix-loop-helix (HLH) domain, which is important for the interaction with other HLH transcription factors, was observed in the three FaPREs deduced proteins (Fig. 3B). It is noteworthy that this HLH domain is highly conserved in all PRE family members from *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2006), as well as in other plants as rice and grape (Fig. 3C) (C., Zhang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Using the Plant-mPLOC program to determine the bioinformatic prediction of FaPREs, a nuclear subcellular localization for these proteins was

predicted (Fig. 3D), as has previously been described in other plant species (Cui *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2017).



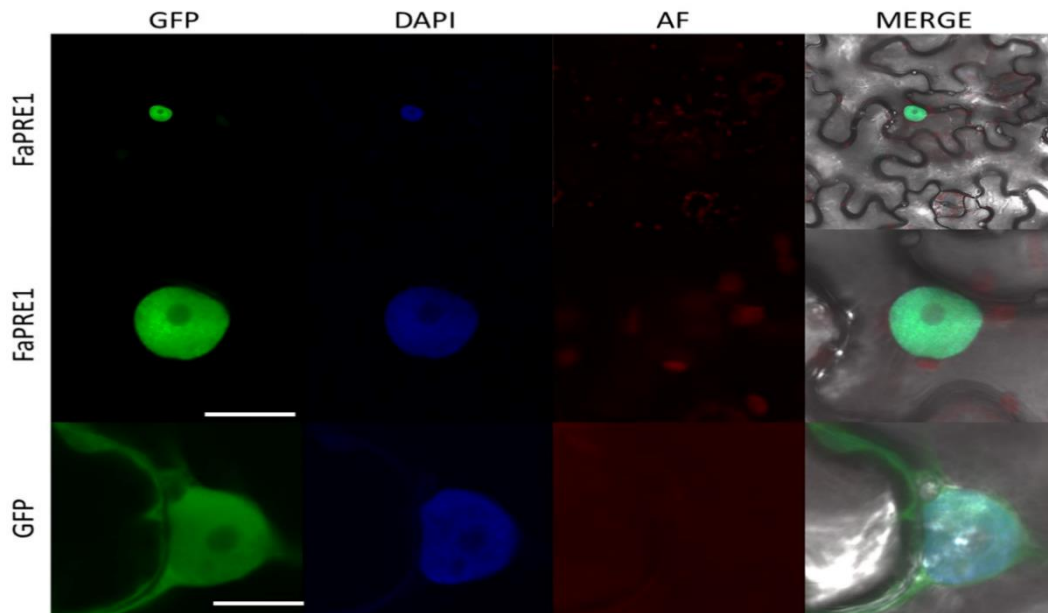
**Fig 3. A.** Table containing additional information of the atypical HLH sequences belonging to subgroup 16. **B.** Screenshot corresponding to the prediction of domains performed with InterProScan database (version 5) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5>). **C.** Sequence alignment of bHLH proteins. Identical amino acids are shaded in black. The two helices are indicated with sets of black arrows and the loop is indicated with a grey line. Numbers indicate amino acid positions. **D.** Screenshot corresponding to the result of protein localization sites prediction in cells performed with the Plant-mPLoc computer program (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLoc.cgi>).

### FaPRE1 protein is located in nucleus

To confirm bioinformatics predictions related to the subcellular location of FaPRE1 protein, we carry out *in vivo* heterologous studies in *N. benthamiana*. For that, a N-terminal translational fusion protein construct between FaPRE1 and GFP proteins was driven under the



control of a CaMV35S promoter. Confocal imaging analysis of the agroinfiltrated leaves indicated that the fusion protein co-localized with the nucleus marker DAPI (Fig. 4).



**Fig 4.** Subcellular localization of FaPRE1-GFP or free GFP upon transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Leaves from *N. benthamiana* were agroinfiltrated with translational constructs 35S-GFP-FaPRE1 and with 35S-GFP as control. Fluorescence signal detected using a confocal microscope. GFP, green fluorescent protein; DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole; AF, Autofluorescence; MERGE, merged view of the GFP and DAPI images. Scale bar: 5  $\mu$ m

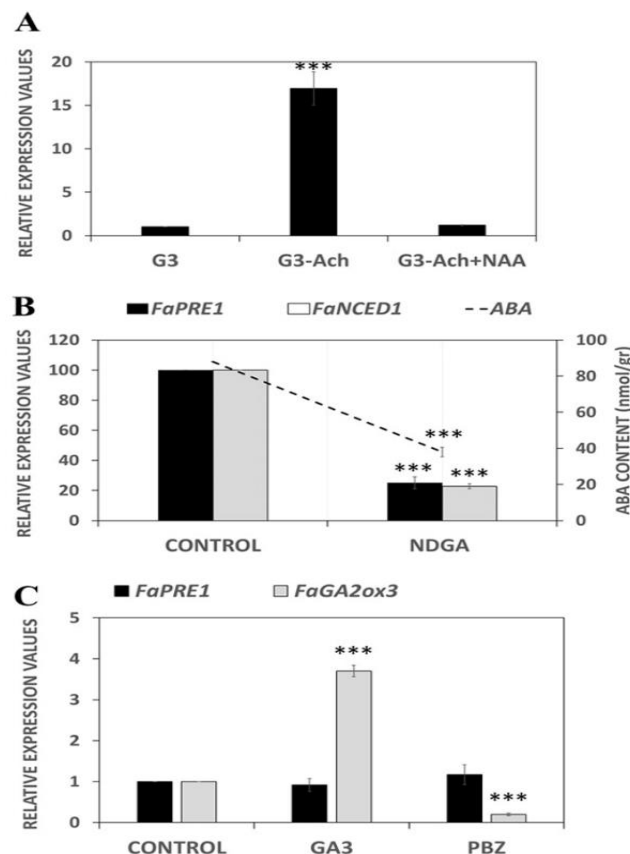
### The spatio-temporal expression of *FaPRE* genes indicates that *FaPRE1* is a ripening-related gene

qRT-PCR studies were performed to determine the spatial expression of the three *FaPRE* genes. Our analysis showed that *FaPRE2* and *FaPRE3* transcription was restricted to vegetative tissues with a scarce or negligible transcription in the receptacle. However, *FaPRE1* was almost exclusively expressed in ripe receptacle (Fig. 1B). For this reason, a more detailed spatio-temporal study of *FaPRE1* expression was carried out in the strawberry receptacle at different stages of growth and ripening. The data indicated that the amount of *FaPRE1* transcript increased steadily along the development and receptacle ripening stages, reaching their highest levels of transcription in the fully ripe stage (R). Afterwards, a slight decrease of transcript was observed in the overripe stage (OR), that was more pronounced in the senescent stage (SN), where only a low transcription level was detected (Fig. 1C). In contrast, transcript levels in achenes, corresponding to the different development and ripening stages, were negligible with respect to the values observed in the receptacle (Fig. 1D). Besides, the *FaPRE1* expression was not significant in vegetative tissues. All these data taken together suggest the participation of *FaPRE1* in the strawberry receptacle ripening process while *FaPRE2* and *FaPRE3* would develop their function in the vegetative tissues of the plant.



### Hormonal regulation of *FaPRE1* genes transcription

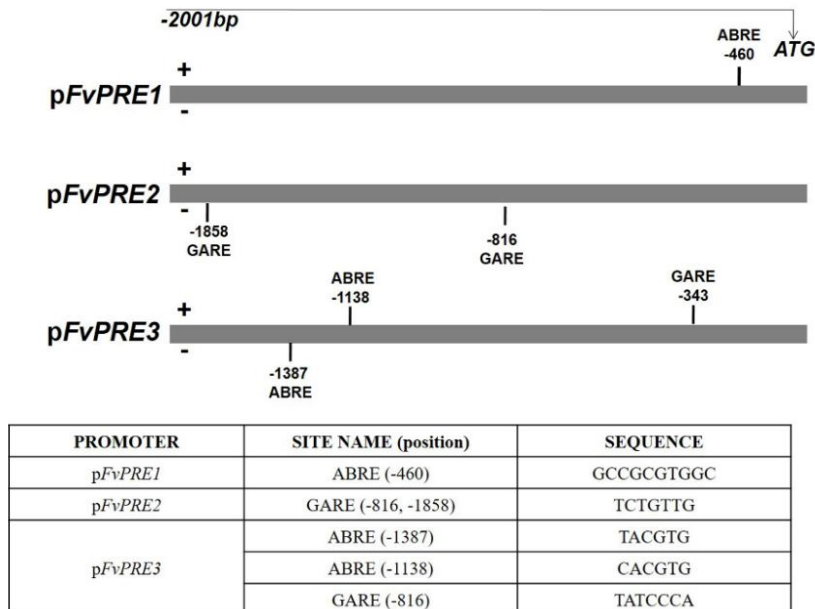
Considering that *FaPRE1* is a ripening-related gene, its regulation by auxins and ABA was studied. It has been previously reported that achenes removal from the surface of immature G3-stage fruits decreases the inner concentration of auxins in the receptacle, which induces the transcription of many ripening-related genes (Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2016). Similarly, the *FaPRE1* transcription increased in de-achened receptacles (G3-achenes) with respect to that observed in control receptacles (G3) (Fig. 5A). As expected, this induction was abolished by the external application of the synthetic auxin IAA (Fig. 5A). Both results suggest that *FaPRE1* gene transcription was negatively regulated by the internal content of auxins in immature receptacles. On the other hand, and supporting the previous data, the transcription of *FaPRE1* decreased in receptacles where ABA production was diminished either by the inhibition of FaNCED1 enzymatic activity through the fruit treatment with NDGA or by the transitory silencing of the *FaNCED1* transcription (Fig. 5B) (Medina-Puche *et al.*, 2014). This differential hormonal expression pattern shows that, as in the case of many ripening-related genes, *FaPRE1* gene transcription is regulated, directly or indirectly, by the ratio ABA/auxins (Medina-Puche *et al.*, 2016).



**Fig 5.** Hormonal effects in *FaPRE1* gene expression. **A.** Analysis by qRT-PCR of the effects of removing achenes from G3 developing fruits on *FaPRE1* gene expression. **B.** Analysis of *FaPRE1* and *FaNCED1* gene expression (bars) in G-W fruits treated with NDGA in both experimental situations; line indicates the ABA content in the analyzed fruits. **C.** Analysis of the effects of gibberellins on *FaPRE1* and *FaGA2ox3* expression which was used as a control. The increase in the mRNA value was relative to the CONTROL

Ct value of each experiment. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. Statistical significance with respect to the reference sample was determined by the Student's t-test: \*\*\*p < 0.001.

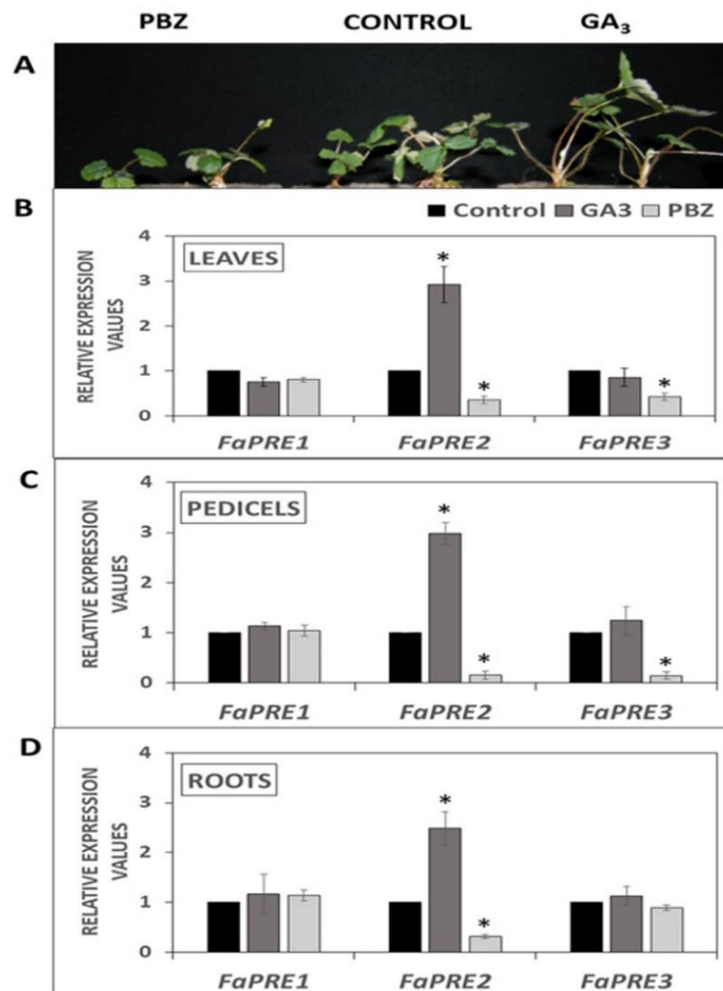
In *A. thaliana*, it has been previously demonstrated that gibberellic acid (GA) regulates cell elongation through the increase of *AtPRE1* transcription (Lee *et al.*, 2006). On the other hand, *SIPRE2* also shows an important role in the cell enlargement along tomato fruit development through GAs (Zhu *et al.*, 2019). In strawberry fruit receptacles, although endogenous GA content has been measured along receptacle development and ripening (Csukasi *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012), the relationship between GAs and fruit ripening has not been established. To determine whether *FaPRE1* transcription is under the control of GAs, strawberry fruit were injected with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) or paclobutrazol (PBZ), a compound that blocks gibberellin biosynthesis. Interestingly, in both cases, no significant changes were detected in *FaPRE1* transcription between treated fruits *versus* untreated control fruits while *GA2ox3*, a control gene related with the GA degradation in strawberry fruit, was induced by GAs and repressed by PBZ treatment respectively (Fig. 5C). Besides, no phenotypic changes were observed in treated fruits compared to controls (data not shown). These results discard that gibberellins affect the *FaPRE1* gene transcription in ripe fruits. This fact was reinforced by the bioinformatic analysis of the p*FaPRE1* promoter that showed the absence of GARE *cis*-regulatory sequences (DNA recognition sites of gibberellin response) in this promoter (Fig. 6).



**Fig 6.** Schematic diagram of FvPRE1, FvPRE2 and FvPRE3 promoters from *Fragaria vesca*. The bar on top indicates the length of the promoter fragment relative to the ATG codon. ABRE and GARE motif are marked within their position in promoter sequence

On the contrary, *in vitro* strawberry plants treated with GA<sub>3</sub> showed morphological changes that resulted in elongated plants while PBZ treated plants displayed a dwarfed phenotype (Fig. 7A). The analysis of *FaPRE* genes transcription in leaves, pedicel and root of the treated

versus untreated plants showed that *FaPRE2* increased its transcription in all the analyzed tissues from GA<sub>3</sub> treated-plants while *FaPRE3* transcription did not vary with respect to the control (Fig. 7B-D). In addition, *FaPRE2* and *FaPRE3* transcription was significantly reduced in all tissues in the presence of PBZ (Fig. 7B-D). This suggests that both *FaPRE2* and *FaPRE3* are under the regulation of GA<sub>3</sub> and probably play an active role in gibberellin signaling in vegetative tissues but not in fruits. Moreover, the promoter analysis of both genes presents GARE-motifs. In the p*FaPRE2* promoter region two GARE-motifs were present, whereas in p*FaPRE3* only one was present (Fig. 6). These data not only support the idea that the *FaPRE2* and *FaPRE3* transcription is regulated by gibberellins but relate the transcript level of each gene in response to this hormone with the number of GARE-motifs identified in their promoter sequences. Furthermore, these results support the proposal that the transcription of *FaPRE1* is independent of GA<sub>3</sub> levels.



**Fig 7.** Phenotypic analysis of *F. × ananassa* “Chandler” *in vitro* plants grown in N30K medium supplemented with hormones. **A** General view of control plants (CONTROL) and treated plants with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and paclobutrazol (PBZ) after 11 dpt. Analysis by qRT-PCR of *FaPRE1*, *FaPRE2* and *FaPRE3* expression in leaves **B**, pedicels **C** and roots **D** from *in vitro* strawberry plants (*F. × ananassa* “Chandler”) treated with GA<sub>3</sub> and PBZ. Mean values ± SD of three independent experiments are shown. CONTROL, plants in N30K medium; GA<sub>3</sub>, plants in N30K medium supplemented with GA<sub>3</sub> 100 μM; PBZ, plants in N30K medium supplemented with paclobutrazol 100 μM. Statistical significance with respect to the reference sample (Control) was determined by the Student’s t-test: \*p < 0.05.

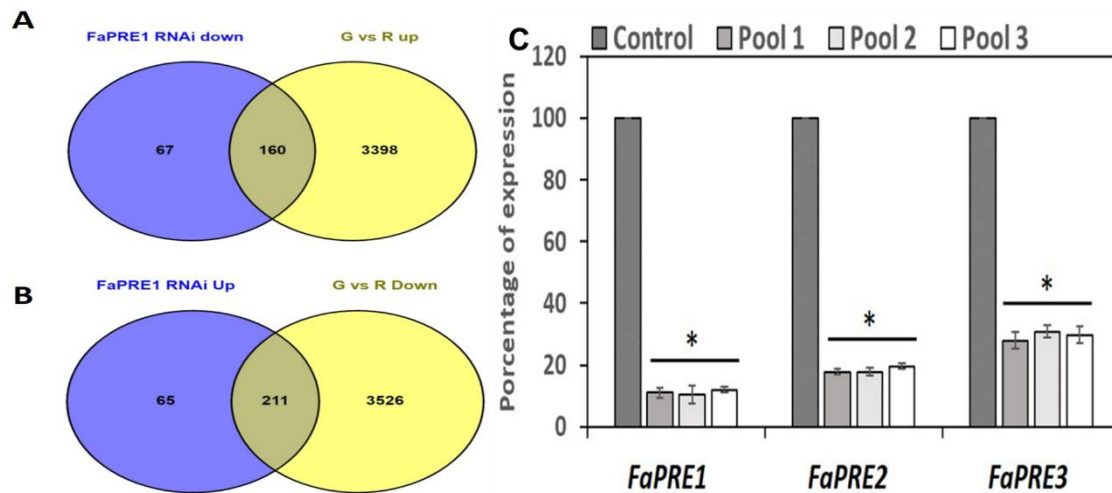
## High-throughput transcriptional analysis of transgenic receptacle where the *FaPRE1* transcription was silenced

Considering that *FaPRE1* is a transcriptional co-regulator, to determine the putative functional role that *FaPRE1* plays along the ripening process, we proceeded to transiently silence its transcription in ripened fruit by RNAi-*FaPRE1* agroinfiltration approaches. RNAi-*FaPRE1* silenced receptacles did not show any phenotypical changes when compared to control receptacles (data not shown). Using a custom-made oligo-based microarray platform (Medina-Puche *et al.*, 2016), a transcriptomic comparison between transgenic receptacle, where the *FaPRE1* transcription was silenced, *versus* control receptacles was carried out (Fig 8C, Additional file 2) and the obtained data were validated by qRT-PCR (Table 1).

**Table 1.** Expression data of selected genes in *FaPRE1*-silenced receptacles obtained by QRT-PCR and microarray analysis.

	Fold array	Fold qRT-PCR	Annotation
<b>Transcription factors</b>			
<i>gene24941</i>	-6.935	-3.281	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 13 [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene31413</i>	-4.672	-5.880	R2R3-MYB transcription factor MYB10 [Fragaria x ananassa]
<i>gene28720</i>	-6.114	-4.080	Probable WRKY transcription factor 71 [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene04424</i>	-3.100	-3.290	NAC domain-containing protein 100 [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene18656</i>	-11.170	-4.545	Homeobox-leucine zipper protein ATHB-12-like [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene28435</i>	-3.541	-10.558	Emission of benzenoids II protein (FaEOBII) [Fragaria x ananassa subsp. ananassa]
<b>Cell wall-related genes</b>			
<i>gene31030</i>	-4.158	-9.170	Probable rhamnogalacturonate lyase B (FaRGLyase1) [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene21638</i>	-12.174	-14.420	Polygalacturonase (FaPG1) [Fragaria x ananassa]
<i>gene03442</i>	-5.179	-1.360	Endoglucanase 11-like [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene23967</i>	-8.365	-4.250	Cellulose synthase-like protein H1 [Rosa chinensis]
<b>Aroma-related genes</b>			
<i>gene28407</i>	-9.065	-3.219	Quinone oxidoreductase [Fragaria x ananassa]
<i>gene18229</i>	-6.058	-7.420	Short-chain dehydrogenase TIC 32, chloroplastic [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene21391</i>	-3.436	-9.040	Quinone oxidoreductase-like protein 2 homolog [Fragaria vesca subsp. vesca]
<i>gene14837</i>	-9.972	-8.299	O-acyltransferase WSD1-like [Rosa chinensis]
<i>gene14266</i>	-3.223	-6.929	NADPH:quinone oxidoreductase-like [Rosa chinensis]
<i>gene07931</i>	-13.792	-8.210	Alcohol acyl transferase (FaAAT2) [Fragaria x ananassa]
<i>gene34009</i>	-4.920	-3.862	Alcohol acyltransferase (FaAAT1) [Fragaria x ananassa]
<i>gene24674</i>	-6.310	-4.824	(3S,6E)-Nerolidol synthase 1, chloroplastic-like isoform X2 [Fragaria vesca subsp. vesca]
<b>Phenylpropanoid-related genes</b>			
<i>gene23367</i>	-3.410	-7.990	Chalcone--flavonone isomerase 1
<i>gene14611</i>	-4.091	-6.730	Flavanone 3-hydroxylase [Fragaria x ananassa]
<i>gene26825</i>	-3.492	-9.346	Chalcone synthase [Fragaria x ananassa]
<i>gene20725</i>	-3.604	-2.290	Putative UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase 1 [Rosa chinensis]
<i>gene18732</i>	-3.176	-2.451	Glutathione S-transferase [Rosa chinensis]
<i>gene09427</i>	-3.233	-7.265	Glutathione S-transferase [Rosa chinensis]
<i>gene29482</i>	-3.196	-4.230	Cinnamoyl-CoA reductase 1 isoform X2 [Populus trichocarpa]
<i>gene25260</i>	-17.792	-13.090	Eugenol synthase 2 [Fragaria x ananassa] (FaEGS2)
<i>gene13540</i>	-4.382	-6.400	Isoflavone reductase homolog [Rosa chinensis]

The transcriptomic results and their comparison with red receptacle transcriptomes (Medina-Puche *et al.*, 2016), showed that the transcription of 227 genes was down-regulated in *FaPRE1* silenced ripen receptacles, out of which 160 (70%) were also ripening-related genes (Additional file 3, Fig 8A). By way of contrast, the transcription of 276 genes was up-regulated in RNAi-*FaPRE1* receptacles, out of whom 211 (76%) were overexpressed in immature strawberry receptacles (Additional file 4, Fig 8 B).



**Fig 8.** Venn diagrams showing the number of genes down-regulated (**A**) and up-regulated (**B**) in strawberry *FaPRE1*-RNAi receptacles respectively and up-regulated in strawberry red receptacle. **C** Analysis by qRT-PCR of *FaPRE1*, *FaPRE2* and *FaPRE3* gene expression in strawberry transgenic receptacle agroinfiltrated with the RNAi-*FaPRE1* construct. Control: receptacle agroinfiltrated with the empty pFRN vector; Pool 1, 2 and 3: receptacles agroinfiltrated with *FaPRE1*-pFRN construct.

Among the ripening related genes whose transcription was downregulated in RNAi-*FaPRE1* ripen receptacles, we found transcription factors as *FaMyb10* (*gene31413*) and *FaEOBII* (*gene28435*) (Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015) (Additional files 2, 3). Both TFs, with a regulatory role in the flavonoid/phenylpropanoid pathway during ripening, were significantly down-regulated in transgenic receptacle with *FaPRE1* transcription silenced (Table 1). The same behavior was shown by other genes whose function is described in strawberry during its ripening process, such as *gene21638* (*FaPG1*, *polygalacturonase-1*; (Quesada *et al.*, 2009)) and *gene31030* (*FaRGlyaseI*, *rhamnogalacturonate lyase-1*; (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013)), which synthesize hydrolytic enzymes related with the cell wall dismantling during the ripening; *gene28407* (*FaQR*, *Quinone oxidoreductase*; (Fu *et al.*, 2017)), *gene07931* (*FaAAT2*, *Alcohol acyl transferase-2*; (Cumplido-Laso *et al.*, 2012)) and *gene34009* (*FaAAT1*, *Alcohol acyl transferase-1*; (Aharoni *et al.*, 2000)), which synthesize enzymes involved in the biosynthesis of esters that contribute to the final aroma of the fruit; and *gene14611* (*FaF3H*, *Flavanone 3-hydroxylase*; (Almeida *et al.*, 2007)), *gene20700* (*FaCAD1*, *cinnamyl alcohol dehydrogenase-1*; (Blanco-Portales *et al.*, 2002)) and *gene25260* (*FaEGS2*, *Eugenol synthase-2*; (Araguez *et al.*, 2013)), related to the phenylpropanoids biosynthesis in strawberry ripe fruit (Table 2). All these results seem to indicate that *FaPRE1* gene might have a regulatory function in the strawberry ripening process.

**Table 2.** Selected genes down-regulated in strawberry FaPRE1-RNAi fruits (fold change RNAi) and up-regulated in strawberry red fruit (fold ripening). Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org>)

Gene ID v2.02	Gene ID v4.01	Fold FaPRE1-RNAi	p-value	Fold ripening	p-value	Annotation
<b>Transcription factors</b>						
<i>gene31413</i>	<i>FvH4_1g22020</i>	-4.672	0.0063	62,013 up	0.0003	R2R3-MYB transcription factor MYB10 [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene28720</i>	<i>FvH4_6g38370</i>	-6.114	0.0010	24,423 up	0.0001	Probable WRKY transcription factor 71 [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]
<i>gene28435</i>	<i>FvH4_6g50930</i>	-3.541	0.0902	46,063 up	0.0001	Emission of benzenoids II protein (FaEOBII) [ <i>Fragaria x ananassa</i> subsp. <i>ananassa</i> ]
<i>gene24494</i>	<i>FvH4_6g37880</i>	-3.978	0.0018	5,938 up	0.0008	Floral homeotic protein AGAMOUS (similar to)
<i>gene30404</i>	<i>FvH4_3g04920</i>	-3.714	0.0043	3,350 up	0.0023	RING finger protein 141 (probable)
<b>Cell wall-related genes</b>						
<i>gene31030</i>	<i>FvH4_1g03300</i>	-4.158	0.0017	12,019 up	0.0001	Probable rhamnogalacturonate lyase B (FaRGLyase1) [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]
<i>gene21638</i>	<i>FvH4_6g41380</i>	-12.174	0.0015	143,225 up	0.0001	Polygalacturonase (FaPG1) [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene03442</i>	<i>FvH4_3g23380</i>	-5.179	0.0070	68,112 up	0.0001	Endoglucanase 11-like [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]
<i>gene23967</i>	<i>FvH4_6g42840</i>	-8.365	0.0023	2,095 up	0.0640	Cellulose synthase-like protein HI [ <i>Rosa chinensis</i> ]
<i>gene01127</i>	<i>FvH4_6g41740</i>	-10.229	0.0012	14,391 up	0.0036	Exopolysaccharuronase, Precursor (putative)
<b>Aroma-related genes</b>						
<i>gene28407</i>	<i>FvH4_6g50700</i>	-9.065	0.0017	24,311 up	0.0057	Quinone oxidoreductase [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene18229</i>	<i>FvH4_6g14170</i>	-6.058	0.0020	9,481 up	0.0002	Short-chain dehydrogenase TIC 32, chloroplastic [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]
<i>gene14837</i>	<i>FvH4_3g28240</i>	-9.972	0.0065	936,377 up	0.0001	O-acyltransferase WSD1-like [ <i>Rosa chinensis</i> ]
<i>gene14266</i>	<i>FvH4_7g03220</i>	-3.223	0.0197	3,626 up	0.0013	NADPH:quinone oxidoreductase-like [ <i>Rosa chinensis</i> ]
<i>gene07931</i>	<i>FvH4_3g38870</i>	-13.792	0.0011	23,478 up	0.0377	Alcohol acyl transferase (FaAAT2) [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene34009</i>	<i>FvH4_7g18570</i>	-4.92	0.0014	4,079 up	0.0013	Alcohol acyltransferase (FaAAT1) [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene34008</i>	<i>FvH4_7g18560</i>	-3.533	0.0044	10,837 up	0.0006	BAHD acyltransferase At5g47980 (probable)
<i>gene28406</i>	<i>FvH4_6g50700</i>	-3.228	0.0105	2,304 up	0.0221	Quinone oxidoreductase-like protein At1g23740, chloroplastic, Precursor (similar to)
<i>gene24674</i>	<i>FvH4_3g03050</i>	-6.31	0.0019	10,657 up	0.0005	(3S,6E)-Nerolidol synthase 1, chloroplastic-like isoform X2 [ <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ]
<b>Phenylpropanoid-related genes</b>						
<i>gene20698</i>	<i>FvH4_1g19270</i>	-4.685	0.0018	10,549 up	0.0001	Probable mannitol dehydrogenase (putative)
<i>gene31672</i>	<i>FvH4_1g27460</i>	-4.427	0.0019	529,169 up	0.0001	glutathione S-transferase F11-like (FaGST1)
<i>gene14611</i>	<i>FvH4_1g11810</i>	-4.091	0.0149	2,749 up	0.0011	Flavanone 3-hydroxylase [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene26825</i>	<i>FvH4_7g01160</i>	-3.492	0.0139	3,092 up	0.0044	Chalcone synthase [ <i>Fragaria x ananassa</i> ]
<i>gene20725</i>	<i>FvH4_1g19390</i>	-3.604	0.0023	10,787 up	0.0028	Putative UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase 1 [ <i>Rosa chinensis</i> ]
<i>gene29482</i>	<i>FvH4_7g01560</i>	-3.196	0.0060	4,517 up	0.0012	Cinnamoyl-CoA reductase 1 isoform X2 [ <i>Populus trichocarpa</i> ]
<i>gene25260</i>	<i>FvH4_2g09110</i>	-17.792	0.0016	207,001 up	0.0001	Eugenol synthase 2 [ <i>Fragaria x ananassa</i> ] (FaEGS2)
<i>gene20700</i>	<i>FvH4_1g19270</i>	-5.07	0.0059	11,743 up	0.0001	Cinnamyl alcohol dehydrogenase-1 (FaCAD1)
<i>gene20698</i>	<i>FvH4_1g19270</i>	-4.685	0.0018	10,549 up	0.0001	Probable mannitol dehydrogenase (putative)
<i>gene26353</i>	<i>FvH4_2g05620</i>	-4.482	0.0082	3,907 up	0.0009	Anthocyanin 3'-O-beta-glucosyltransferase (3'GT) (putative)
<i>gene29483</i>	<i>FvH4_7g01590</i>	-6.681	0.0041	6,188 up	0.0003	Dihydroflavonol-4-reductase (DFR) (probable)
<b>Miscellaneous</b>						
<i>gene33976</i>	<i>FvH4_6g40060</i>	-8.451	0.0021	7,217 up	0.0037	BAHD acyltransferase At5g47980 (probable)
<i>gene23793</i>	<i>FvH4_3g07080</i>	-7.991	0.0011	7,836 up	0.0005	Aquaporin NIP1-1 (similar to)
<i>gene23794</i>	<i>FvH4_3g07080</i>	-7.664	0.0010	8,329 up	0.0005	Aquaporin NIP1-2 (AtNIP1) (similar to)
<i>gene00277</i>	<i>FvH4_3g07080</i>	-6.197	0.0010	6,030 up	0.0004	Aquaporin NIP1-2 (AtNIP1) (similar to)
<i>gene34011</i>	<i>FvH4_7g18640</i>	-5.525	0.0014	4,134 up	0.0331	BAHD acyltransferase At5g47980 (probable)
<i>gene14841</i>	<i>FvH4_3g28210</i>	-5.884	0.0038	6,858 up	0.0007	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 4 (AtGA3ox4) (probable)
<i>gene07028</i>	<i>FvH4_4g18550</i>	-4.129	0.0021	106,577 up	0.0001	Multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE-1) (probable)
<i>gene00616</i>	<i>FvH4_4g35840</i>	-2.859	0.0223	2,157 up	0.1670	Probable NAD(P)H-dependent oxidoreductase 1

On the other hand, the *FaPRE1* silencing induced the expression of genes whose transcription was higher in immature green receptacles, in the development and growth stages, but not in ripening stages. Most of these genes are related with the metabolism and remodeling of the cell wall, both vital processes for the fruit growth and development. Thus, the *FaPRE1* silencing induced clearly the transcription of the *gene01986* and *gene02631* that encode a *Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* and a *Xyloglucan glycosyltransferase* respectively (Table 3).

These genes could be related with the hydroxylation and reconnection of xyloglucan fragments during the wall growth (Barnes and Anderson, 2018). Similarly, *gene23429* (*Pectate lyase*) and *gene04435* (*Expansin-A1*) are also up-regulated in *FaPRE1*-RNAi receptacles. *PLs*

and *Expansins* have been related to cell elongation and cell wall extensibility (Barnes and Anderson, 2018) (Table 3). In addition, the transcription of *gene20426* and *gene26607* was also induced in the same receptacles. Both genes encode beta-glucosidases, enzymes that are potentially involved in cellulose degradation (Barnes and Anderson, 2018) (Table 3). Otherwise, the transcription of *gene09384*, *gene11861* and *gene24005*, that encode an *Auxin efflux carrier*, an *Auxin-responsive protein IAA27*, and an *Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1* respectively, was additionally over-expressed in *FaPRE1*-RNAi receptacles (Table 2). These three genes are related to the response to auxins which is the hormone that regulates the strawberry receptacle growth and development (Perkins-Veazie, 1995).

**Table 3.** Selected genes up-regulated in strawberry *FaPRE1*-RNAi receptacles (fold *FaPRE1*-RNAi) and down-regulated in strawberry red receptacles (fold ripening). Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>)

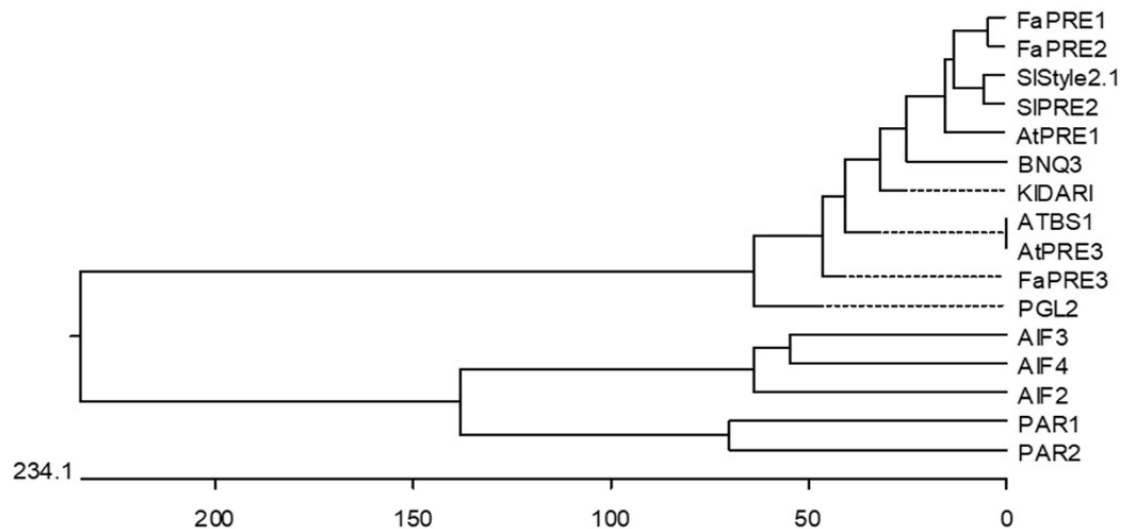
Gene ID v2.02	Gene ID v4.01	Fold <i>FaPRE1</i> -RNAi	p-value	Fold ripening	p-value	Annotation
<b>Biotic stress/Plant defense</b>						
<i>gene34043</i>	<i>FvH4_3g44790</i>	3,166	0,0117	-2,83	0,0234	Disease resistance response protein 206 (probable)
<i>gene07623</i>	<i>FvH4_2g01540</i>	20,061	0,0028	-7,528	0,0268	Thaumatococin-like protein 1, Precursor (similar to)
<i>gene29468</i>	<i>FvH4_7g01430</i>	14,096	0,0105	-2,341	0,0050	Polyamine oxidase (PAO)
<b>Cell wall-related genes</b>						
<i>gene23429</i>	<i>FvH4_7g18400</i>	9,278	0,0038	-8,326	0,0005	Pectate lyase 12
<i>gene20426</i>	<i>FvH4_2g08690</i>	4,873	0,0024	-2,571	0,0116	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7 ((1->3)-beta-glucanase 7)
<i>gene14102</i>	<i>FvH4_3g36000</i>	5,079	0,0070	-2,482	0,0094	fasciclin-like arabinogalactan protein
<i>gene18252</i>	<i>FvH4_6g20860</i>	11,107	0,0012	-3,61	0,0038	Fasciclin-like arabinogalactan protein 17
<i>gene15268</i>	<i>FvH4_3g29120</i>	19,349	0,0017	-21,293	0,0004	FASCICLIN-like arabinogalactan protein
<i>gene26607</i>	<i>FvH4_7g22480</i>	11,657	0,0010	-4,075	0,0013	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase
<i>gene04435</i>	<i>FvH4_6g48210</i>	6,986	0,0025	-7,725	0,0002	Expansin-A1
<i>gene01986</i>	<i>FvH4_6g43860</i>	14,122	0,0247	-7,025	0,0028	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 9
<i>gene32082</i>	<i>FvH4_5g04440</i>	7,881	0,0012	-2,172	0,0022	Polygalacturonase
<i>gene29850</i>	<i>FvH4_4g10050</i>	4,234	0,0016	-2,24	0,0349	UDP-glucuronate 4-epimerase 1
<i>gene02631</i>	<i>FvH4_2g32570</i>	5,374	0,0014	-2,845	0,0092	Xyloglucan glycosyltransferase 12
<b>Hormones</b>						
<i>gene09384</i>	<i>FvH4_5g17310</i>	25,473	0,0054	-28,871	0,0007	auxin efflux carrier
<i>gene11861</i>	<i>FvH4_1g05630</i>	7,803	0,0011	-2,256	0,0466	auxin-responsive protein IAA27
<i>gene10566</i>	<i>FvH4_2g25330</i>	9,006	0,0089	-11,331	0,0053	Putative indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.9 (AtGH3-9)
<i>gene30958</i>	<i>FvH4_1g04080</i>	8,532	0,0011	-4,069	0,0455	DELLA protein GAI
<i>gene06210</i>	<i>FvH4_4g34110</i>	3,242	0,0026	-2,707	0,0125	GAI1
<i>gene24005</i>	<i>FvH4_1g16980</i>	26,543	0,0193	-52,235	0,0007	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1
<b>Phenylpropanoids related genes</b>						
<i>gene15877</i>	<i>FvH4_6g27940</i>	14,144	0,0066	-9,729	0,0022	4-coumarate-CoA ligase 2 (4CL 2)
<i>gene24665</i>	<i>FvH4_3g02980</i>	3,069	0,0402	-11,452	0,0003	Leucoanthocyanidin reductase (LAR)
<i>gene34393</i>	<i>FvH4_3g05830</i>	4,36	0,0014	-13,128	0,0006	UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase 1
<i>gene03834</i>	<i>FvH4_6g48750</i>	9,664	0,0060	-5,902	0,0054	isoflavone-7-O-beta-glucoside 6"-O-malonyltransferase
<b>Transcription factors</b>						
<i>gene12308</i>	<i>FvH4_4g06830</i>	3,167	0,0036	-2,967	0,0121	Probable WRKY transcription factor 11
<i>gene28958</i>	<i>FvH4_3g09890</i>	3,823	0,0028	-2,069	0,0293	BTB/POZ domain-containing protein At1g30440 (similar to)
<i>gene01554</i>	<i>FvH4_1g17280</i>	8,053	0,0023	-3,273	0,0007	BTB/POZ domain-containing protein At5g48800 (probable)
<b>Transporter activity</b>						
<i>gene23712</i>	<i>FvH4_2g15440</i>	8,28	0,0010	-2,367	0,0266	Aquaporin PIP2-7
<i>gene25767</i>	<i>FvH4_6g31970</i>	16,648	0,0023	-2,439	0,0053	Aquaporin (TIP2:1)

## Discussion

In this article, we present the functional characterization of the *FaPRE1*, a gene belonging to the strawberry *FaPRE* family (*FaPRE1*, *FaPRE2* and *FaPRE3*), which are the putative orthologous of the *AtPRE* genes from *Arabidopsis thaliana*

*FaPRE1* gene was classified as member of the subfamily of atypical bHLHs by lacking a DNA binding domain. In this subfamily are also included both the *ILI-1* gene from rice (Ikeda *et*

*al.*, 2013), *SIPRE2* from tomato (Zhu *et al.*, 2017), as well as the members of the *Arabidopsis* *PRE* family (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) (Figure 2, 9, Additional file 1). *AtPRE1* (Lee *et al.*, 2006), *ATBS1* (Wang *et al.*, 2009), *PGL1* and *APG* (Heang and Sassa, 2012a; Heang and Sassa, 2012b), and *IBH1* (Ikeda *et al.*, 2012) which are involved in transcriptional regulatory processes as repressors, through the blockage by heterodimerization of bHLH transcription factors. As expected by bioinformatic analysis, a nuclear localization of *FaPRE1* (Fig. 3D, 4) supports their relationship with transcriptional regulatory processes. According to our experimental data the *FaPRE1* could play a similar role in strawberry fruit ripening process.



**Fig 9.** Phylogenetic tree of some functionally characterized atypical HLH transcription factors. 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. *FaPRE1* (KM655802; *Fragaria x ananassa*); *FaPRE2* (XM\_004296502; *F. x ananassa*); *FaPRE3* (XM\_004297270; *F. x ananassa*); *SiStyle2.1* (NM\_001247361; *Solanum lycopersicum*) (Chen *et al.*, 2007); *SIPRE2* (XP\_004233358.1; *S. lycopersicum*) (Zhu *et al.*, 2019); *AtPRE1* (At5g39860; *Arabidopsis thaliana*) (Lee *et al.*, 2006); *BNQ3* (NP\_190355.2; *A. thaliana*) (Mara *et al.*, 2010); *KIDARI* (NP\_849712; *A. thaliana*) (Hyun and Lee, 2006); *ATBS1* (NP\_177590; *A. thaliana*) (Ikeda *et al.*, 2013); *AtPRE3* (At1g74500; *A. thaliana*) (Castelain *et al.*, 2012); *PGL2* (Os02g0747900; *Oryza sativa*) (Heang and Sassa, 2012a); *AIF2* (At3g06590; *A. thaliana*) (Kim *et al.*, 2017); *AIF3* (At3g17100; *A. thaliana*) (Kim *et al.*, 2017); *AIF4* (At1g09250; *A. thaliana*) (Kim *et al.*, 2017); *PAR1* (At2g42870; *A. thaliana*) (Hao *et al.*, 2012); *PAR2* (At3g58850; *A. thaliana*) (Hao *et al.*, 2012). Sequences were aligned using MegAlign (MegAlign 5.00; DNASTAR).

### ***FaPRE1* and fruit ripening**

*FaPRE1* presented an expression model characteristic of a ripening-related gene, with transcription values negligible in both immature receptacles and vegetative tissues, but high in ripened stages. In strawberry, this is a common transcription pattern that is shared by the vast majority of ripening-related genes (Medina-Puche *et al.*, 2016). This model of expression is characterized by being a) ripening-related; b) receptacle-specific; c) negatively regulated by auxins, and d) induced by ABA. *FaPRE1* follows these criteria since the amount of *FaPRE1* transcript increases along receptacle ripening (Fig. 1C) and is preferentially expressed in mature



red receptacle (Fig. 1B-C). Otherwise, the *FaPRE1* transcription was also negatively regulated by auxins but positively by ABA (Fig. 5A-B).

The spatial-temporal and the hormonal transcription profile of *FaPRE1* are in agreement with the above-mentioned criteria and are also in accordance with the proposal of (Perkins-Veazie, 1995), who suggested that the ABA/auxins ratio determines the transition from the development to the ripening stage in the strawberry receptacle. Thus, auxins would be produced in immature achenes and released to the receptacle promoting its growth but preventing premature ripening. Afterwards, the auxin production would be arrested and subsequently the endogenous biosynthesis of ABA in the receptacle would be stimulated increasing the ABA/auxins ratio and thus promoting the ripening process (Perkins-Veazie, 1995). This proposal was experimentally demonstrated recently (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). A similar transcription pattern has been found in other ripening-related genes that encode transcription factors such as *FaMYB10* (Medina-Puche *et al.*, 2014), *FaEOBII* (Medina-Puche *et al.*, 2015) or *FaDOF2* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017). Furthermore, it has been reported that *PRE*-like genes are under the positive regulation of GAs (Lee *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2012). That is not the case of the *FaPRE1* gene since the treatment of receptacles with GA<sub>3</sub> did not result in an increase of its expression, unlike the *GA2ox3* control gene, discarding any involvement of this hormone in the regulation of *FaPRE1* transcription in ripe strawberry fruit (Fig. 5C). This assumption is reinforced by the absence of regulatory sequences response to GAs (GARE-motifs) in the *pFvPRE1* promoter (Fig. 6). However, these motifs are present in the *pFvPRE2* and *pFvPRE3* promoters, two genes that have a specific expression of vegetative tissues. All these expression data suggest that *FaPRE1* plays a different physiological role than *FaPRE2* and *FaPRE3*, mainly focused on the process of fruit ripening.

In soft fruits, with the exception of tomato, the functional role played by *PRE*-like genes during the fruit ripening process has not been studied. Very recently, the relationship between a *PRE*-like atypical HLH gene (*SIPRE2*) and the growth of tomato fruit has been established (Zhu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019). Thus, in tomato immature fruit, *SIPRE2* seems to have a repressor role of chlorophyll accumulation and chloroplast development. In addition, it represses the transcription of genes involved in the carotenoid's biosynthesis during the fruit ripening process (Zhu *et al.*, 2017). However, *SIPRE2* presents a different expression pattern from that observed for *FaPRE1*. Thus, while *SIPRE2* was expressed in both fruit and vegetative tissues as root, young leaf, mature leaf, senescent leaf, flower and sepal, the *FaPRE1* transcription was restricted to the ripened receptacle. In tomato vegetative tissues, the highest transcription levels were found in young leaf and in flowers where the elongation processes are more active. This is not the case of *FaPRE1*, whose transcription is mainly limited to the final stages of receptacle ripening, in which the processes of cellular elongation are not significant. Besides, *SIPRE2* was expressed strongly

in small tomato immature fruit, but its transcript level decreased with the growth, although at a later point its transcription increased slightly along the ripening process (Zhu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019).

On the contrary, the *FaPRE1* transcription raised continuously throughout the receptacle ripening. The expression data suggest that *FaPRE1* plays a physiological function different from that played by *SIPRE2* in tomato fruit. Otherwise, the *SIPRE2* overexpression (35S-*SIPRE2*) in tomato fruits gave rise to a decrease of both chlorophyll and carotenoid content in unripe and ripe fruits respectively. This fact was accompanied by a down-regulation of the transcript levels of genes related to chlorophyll metabolism and light signaling as *GLK2*, *HY5*, *RbcS* and *Cab7* in fruits. Additionally, the transcription of genes involved in the biosynthesis of carotenoids such as phytoene synthase1 (*PSY1*), phytoene desaturase (*PDS*), and  $\zeta$ -carotene desaturase (*ZDS*) was significantly down-regulated in 35S-*SIPRE2* transgenic ripe fruits, with a concomitant reduction of lycopene content (Zhu *et al.*, 2017). These findings indicated that *SIPRE2* regulates the chlorophyll and carotenoid content by repressing the expression of these chlorophyll and carotenoid biosynthetic genes. Besides, *SIPRE2* determine fruit size probably through a pathway  $GA_3$ -dependent that regulate the pericarp cell expansion (Zhu *et al.*, 2019). However, in the strawberry ripening process, the regulatory *FaPRE1* function seems to be quite different from that of *SIPRE2*. Certainly, the comparative analysis carried out between the *FaPRE1*-RNAi and control receptacles transcriptomes have shown that *FaPRE1* plays a dual function regulating the transcription of two groups of genes whose expression models are antagonistic. One of these groups includes those genes that are ripening-related and mainly expressed in the receptacle during the fruit ripening process, while the other group contains those genes that have an expression profile that is more related to the vegetative growth of the receptacle (Additional files 3, 4).

Among the genes whose transcription may be influenced by *FaPRE1* in ripened receptacles, we found genes involved in several metabolic processes related to the organoleptic properties of fruit. For instance, genes involved in the regulation of the transcription of those genes belonging to the flavonoid/phenylpropanoid metabolism and that codes two R2R3 MYB transcriptional factors as *FaMYB10* and *FaEOBII* (Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015). We have previously demonstrated that *FaMYB10* regulates the transcription of most of the Early-regulated Biosynthesis Genes (EBGs) and Late-regulated Biosynthesis Genes (LBGs) involved in the flavonoid/phenylpropanoid pathway, including flavonol-3-hydroxylase (*FaF3H*), *chalcone synthase* (*FaCHS*), *dihydroflavonol reductase* (*DFR*), *cinnamoyl -CoA reductase* (*FaCCR*), *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (*FaCAD1*), and *eugenol synthase-2* (*FaEGS2*) (Medina-Puche *et al.*, 2014). Also, *FaMYB10* regulates the *FaEOBII* expression,

which in turn regulates the transcription of the gene that encodes the FaEGS2, an enzyme involved in the biosynthesis of the phenylpropanoid volatile eugenol (Araguez *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2015). The transcription of all these genes was also down-regulated in *FaPRE1*-RNAi receptacles (Table 4).

**Table 4.** Selected genes down-regulated in strawberry *FaPRE1*-RNAi receptacles (Fold change *FaPRE1*-RNAi), *FaMYB10*-RNAi receptacles (Fold change *FaMYB10*-RNAi) and NDGA-treatment receptacles and up-regulated in strawberry red receptacle (Fold change ripening). Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011). *FaMYB10*-RNAi data are extracted from (Medina-Puche *et al.*, 2014) while NDGA data are extracted from (Medina-Puche *et al.*, 2016).

Gene ID v2.02	Gene ID v4.01	Fold <i>FaPRE1</i> -RNAi	p-value	Fold ripening	p-value	Fold <i>FaMYB10</i> -RNAi	p-value	Fold NDGA	p-value	Annotation	Blast Top Hit Accession
<i>gene14611</i>	<i>FvH4_1g11810</i>	-4,091	0,0149	2,749	0,0011	-111,839	0,0014	-44,072	0,00001	Flavanone 3-hydroxylase	AAU04792.1
<i>gene20700</i>	<i>FvH4_1g19270</i>	-5,070	0,0012	11,743	0,0001	-37,965	0,0011	-26,731	0,00000	Cinnamyl alcohol dehydrogenase ( <i>FaCAD1</i> )	Q9ZRF1
<i>gene25260</i>	<i>FvH4_2g09110</i>	-17,793	0,0016	207,001	0,0001	-8,58	0,0004	-16,476	0,00001	Eugenol synthase 2 ( <i>FaEGS2</i> )	AGV02008.1
<i>gene26826</i>	<i>FvH4_7g01160</i>	-3,492	0,0120	3,019	0,0051	-22,224	0,0010	-5,265	0,00000	Chalcone synthase	BAE17122
<i>gene28435</i>	<i>FvH4_6g50930</i>	-3,541	0,0902	46,063	0,0001	-3,58	0,0017	-4,173	0,00049	Emission of benzenoids II ( <i>FaEOBII</i> )	AJZ73158
<i>gene29482</i>	<i>FvH4_7g01560</i>	-3,196	0,0060	4,517	0,0012	-15,476	0,0021	-2,564	0,00006	Cinnamoyl CoA reductase	AAP46143.1
<i>gene31413</i>	<i>FvH4_1g22020</i>	-4,672	0,0063	62,013	0,0003	-419,443	0,0011	-5,166	0,00001	R2R3 MYB transcription factor ( <i>FaMYB10</i> )	ABX79947

These results suggest that *FaPRE1* would play an important regulatory role of the phenylpropanoids pathway, probably through the regulation of the *FaMYB10* transcription through the sequestering of a bHLH whose function would be to suppress the gene expression of this FT in immature receptacle. In addition, the expression of cell wall-related genes as *FaPGI* and *FaRGlyaseI* (Quesada *et al.*, 2009; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013), that has been previously demonstrated that are involved in the cell wall disassembly, was also down-regulated in RNAi-*FaPRE1* receptacles (Table 2).

The same behavior was shown by other genes whose function has been described in strawberry during its ripening process and related with aroma production. For instance, one of the genes whose transcription was down-regulated in RNAi-*FaPRE1* strawberry receptacles was the ripening-related *FaQR* gene, that encodes a quinone oxidoreductase. We have demonstrated that this enzyme is crucial for the furaneol (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone; HDMF) biosynthesis, one of the most important components of the strawberry fruit aroma (Raab *et al.*, 2006). Besides, the transcription of genes which encode two enzymes involved in the biosynthesis of the key esters that contribute to the final aroma of the ripened fruit, such as *FaAAT1* (*Alcohol acyl transferase-1*) and *FaAAT2* (*Alcohol acyl transferase-2*) (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012), was also down-regulated in RNAi-*FaPRE1* strawberry receptacles. All these genes share a common expression profile as receptacle ripening-related genes (Table 2). In

general, all these results seem to indicate that *FaPRE1* gene has a regulatory function in the strawberry ripening process.

As mentioned above, PREs are HLH proteins which lack the basic domain required for DNA binding but dimerize with DNA binding factors bHLH to inhibit their DNA binding ability (Lee *et al.*, 2006; Mara *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019). In this sense, we hypothesize that FaPRE1 might exert its transcriptional regulatory properties through the formation of an inactive FaPRE1 HLH: bHLHa heterodimeric complex that would withdraw the amount of bHLHa available to form a homo or heterodimeric transcriptionally active complex. We propose that this heterodimerization should inhibit the formation of a putative heterodimeric (bHLHa:bHLHb) transcriptional activator. This complex would up-regulate the transcription of non-ripening related genes that are expressed specifically in the immature receptacle. These genes are related to the growth and development stages and must be silenced in ripened receptacles. On the contrary, in ripened receptacles, FaPRE1 would inhibit the formation of another bHLH heterodimeric negative regulatory complex that determines the down regulation of ripening-related genes, but in non-ripened immature receptacles. This repressor would be constituted by a heterodimer of two DNA binding basic helix-loop-helices (bHLHa:bHLHc). Thus, the formation of a repressor complex in ripened receptacle would be inhibited by sequestering one of the monomer partners (bHLHa). In this way, the repression of ripening-related genes would be avoided thus facilitating its expression.

A similar but not identical mechanism of interaction between *FaPRE*-like genes and bHLHs in response to different signals, including light, temperature, BRs and GAs, has been described (Bai *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2013). For instance, three *PRE* genes (PRE1, PRE3/ATBS1, PRE6/KIDARI), positively regulate organ elongation in response to GAs, BRs and light signaling (Hyun and Lee, 2006; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009) through its interaction with other bHLH transcription factors that negatively regulate cell elongation, as AtIBH1, AIFs and HFR1 (Hyun and Lee, 2006; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). In *Arabidopsis thaliana*, a triantagonistic bHLH system cascade negatively regulates cell elongation in response to multiple hormonal and environmental signaling pathways (Bai *et al.*, 2012). In this system, the homodimer HBI1:HBI1 is directly bound to the promoter of two EXPANSIN genes activating its transcription. Otherwise, the interaction of IBH1 with HBI1 inhibits, by heterodimerization, the production of the activator homodimer which in turn determines the repression of both EXPANSIN genes. In addition, PRE1 activates the DNA binding capacity of HBI1 by sequestering its inhibitor IBH1 throughout the PRE1:IBH1 heterodimer formation (Bai *et al.*, 2012). Also, this triantagonistic system has been demonstrated in the interactions between the bHLH Activator of Cell Elongation 1 (ACE1) and two atypical HLH proteins, AtIBH1 and PRE1, in *Arabidopsis* (Ikeda *et al.*, 2012) and between ACE1 and ATBS1 interaction factors

(AIF2, AIF3 and AIF4) or PRE1 in response to BRs and light (Ikeda *et al.*, 2013). Likewise, through a similar regulatory system, the ARF/BZR/PIF interaction stimulates the hypocotyl elongation in *Arabidopsis* (Oh *et al.*, 2014).

Apparently, in strawberry, *FaPRE1* does not play a similar function to that of *SIPRE2* and cannot be considered an orthologous gene. However, its function is clearly involved in the fruit ripening process. In fact, the genes regulated by *FaPRE1* are different to those regulated by *SIPRE2*.

## Conclusions

In summary, this work presents, for the first time in strawberry ripened fruits, experimental data that support an important novel function for the atypical HLH *FaPRE1* during fruit ripening. *FaPRE1* antagonistically coordinated the transcription of genes related to both receptacle growth and ripening. Thus *FaPRE1*, in ripened receptacle, represses the transcription of receptacle growth promoting genes while activating the transcription of those genes related to the receptacle ripening process.

## Methods

### Plant material

*Fragaria × ananassa* Duch. (cv. Camarosa) plants were grown under field conditions in Huelva (S.W. Spain). Strawberry fruits and achenes were harvested at different stages of development and ripening: small-sized green fruits (G1, 2-3 g), middle-sized green fruits (G2, 3-5 g), full-sized green fruits (G3, 4-7 g), white fruits (W, 5-8 g), full-ripe red fruits (R, 10-20 g), over-ripe fruits (OR, 10-20 g) and senescent fruits (SN, 10-20 g). Flowers, floral buds, petals and vegetative tissues such as pedicels and expanding leaves were also collected. *Nicotiana benthamiana* and strawberry plants (*F. × ananassa* Duch. cv. Elsanta) used for infiltration were grown in plant chamber at 25 °C, 10.000 lux and 80 % humidity. All tissues analyzed were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 °C. The strawberry plants were acquired in “Viveros California S.L.” (Huelva, Spain) while *Nicotiana benthamiana* seeds were a gift from Dr. Muñoz-Alamillo.

### Hormonal treatments

With the objective to eliminate the auxins of the fruit, the achenes were carefully removed from two sets of 50 full-sized green fruits (G3) each, in accordance with (Medina-Puche *et al.*, 2014). Briefly, one set of de-achened G3 fruits was covered with lanolin paste containing indole-3-acetic acid (IAA) 1 mM in 1 % (w/v) dimethyl sulphoxide (DMSO). The other group of de-

achened fruits (control group) was covered with the same paste but without IAA. Sample collection and analysis were performed following the instructions by (Medina-Puche *et al.*, 2014).

For the gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) treatment, strawberry fruits were injected at G2 stage with paclobutrazol (PBZ) 100 µM and GA<sub>3</sub> 100 µM. PBZ is a triazole that slows plant growth blocking the synthesis of gibberellins (BUTCHER *et al.*, 1990). Control fruits were injected with water. For each treatment, 30 fruits were infiltrated. Fruits were harvested after 24 hours of experimentation. In parallel, *in vitro* strawberry plants (*F. × ananassa* Duch. cv. Chandler), micropropagated in a N30K medium supplemented with 2.2 mM kinetin (Barceló *et al.*, 1998), were treated with gibberellic acid. Two groups of six independent clones were grown in MS medium supplemented with GA<sub>3</sub> (100 µM) and PBZ (100 µM), respectively, and kept in a growth chamber for 11 days prior harvest. Untreated plants were used as control. All samples and tissues after collection were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 °C.

In order to block ABA biosynthesis, 20 strawberry fruits (*F. x ananassa* cv. Elsanta) in G3 stage of development were injected with nordihydroguaiaretic acid (NDGA) 100 µM. NDGA is an ideal inhibitor of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) enzyme activity (Creelman *et al.*, 1992) and it has previously been demonstrated to decrease endogenous ABA concentration in ripe fruit receptacle (Medina-Puche *et al.*, 2014). The fruits were injected with 1-2 ml of NDGA solution or water (control fruits) and harvested after 8d of treatment, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. These samples were used for measurement of the ABA content and relative expression of *FaPREs* and *FaNCED1* genes.

### **Quantification of abscisic acid content**

Deuterated abscisic acid (dABA) was used as an internal standard. Both the dABA preparation and ABA extraction from strawberry samples were performed following the instructions by (Medina-Puche *et al.*, 2014). In order to determine the ABA amount, a HPLC-MS system (VARIAN 1200L Triple Quadrupole) was used with a column (150 x 2.1 mm i.d. Phenomenex C<sub>18</sub> with 3 µm particle) (California, USA). The conditions and procedure used for the analysis were the same described by (Medina-Puche *et al.*, 2014).

### **Bioinformatic resources**

Resources of 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/>) were used for *in silico* study of *FaPRE* genes sequences against databases. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree construction were performed with

the EBI ClustalW2 program or the MegAlign program (from the Lasergene DNASTAR software package) as well as the FigTree program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The prediction of domains and functional sites was performed with an InterProScan database (version 4.8) ([www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)) and the prediction of protein localization sites in cells was performed with a Plant-mPLOC computer program (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLOC.cgi>). BlastN was also used to localize the genes position in *F. vesca* and *F. x ananassa* genome at a GDR databank (<https://rosaceae.org>). Available *F. vesca* (v 2.0.a2) genome (Li *et al.*, 2017) were used to determine *FaPRE* promoter sequences. The promoter analysis of *FaPRE* genes were performed with the PlantCARE database (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

### **Generation of RNAi constructs and transfection of strawberry fruits by agroinfiltration**

A fragment of 626-pb (RNAi-fragment) from *FaPRE1* cDNA was PCR amplified and cloned into pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen). Later, the RNAi-fragment was transferred to the pFRN binary vector (courtesy of Marten Denekamp) by LR recombination. The RNAi construct (pFRN-*FaPRE1*) generated was tested by sequencing and restriction analyses prior to transformation of strawberry fruit. The RNAi-*FaPRE1* construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. RNAi-construct was used to obtain transient transgenic strawberry fruit with the *FaPRE1* expression silenced by agroinfiltration (Hoffmann *et al.*, 2006). The injection of RNAi-construct was performed with a syringe into the base on the entire fruits attached to the strawberry plant following the indications of (Hoffmann *et al.*, 2006). 30–40 fruits were inoculated and analysed of a total of 15–25 strawberry plants.

### **Subcellular localization analysis**

The construct used for localization studies was derived from the binary vector pK7WGF2, which allows for the N-terminal fusion of the selected protein with GFP (Karimi *et al.*, 2002). The 282-bp CDS of the strawberry *FaPRE1* gene was amplified from *F. x ananassa* cDNA using specific primers (Table 5) and cloned into the pDONR<sup>TM</sup>221. The PCR-product was then transferred to the pK7WGF2 destination vector, resulting in *35S-GFP-FaPRE1* fusion construct. The generated construct was tested through sequencing prior to *N. benthamiana* leaves agroinfiltration. The procedures used for *N. benthamiana* agroinfiltration have been previously described (Medina-Puche *et al.*, 2015; Molina-Hidalgo *et al.*, 2015). *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated with clones to express *FaPRE1*-GFP and GFP. The samples were imaged two days after agroinfiltration on a Leica TCS SP8 point scanning confocal microscope using the pre-set settings for GFP with Ex:488nm, Em:500-550nm. For nuclear staining, samples were stained with a solution of 40 µg/ml DAPI 10 minutes before imaging with Ex:405 nm, Em: 448-525 nm.

**Table 5.** Primer sequences used in this work. Fw: forward; Rv: reverse. Up: upper; Low: lower.

Gene	Purpose	Primer	Sequence 5'-3'	Product size (bp)
<i>FaPRE1</i>	FL sequence	FaPRE1-FL-forward	AAGGGTACCACACTACATAATACTCTAGCTTGCTCA	654
		FaPRE1-FL-reverse	CCTGGATCCCTAGTGCAAAAGCTCTTTATTAATC	
	GFP fusion	antB-PRE1-fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAACAATGCTACGCCGAAGGTCATCAAGCCAGTC	282
		antB-PRE1-rv	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACTGCATAATCAAGCTCTAAAAATGGC	
	FaPRE1_3'UTR	FaPRE1_3'UTR_Fw	CCATGATCATCAAGCAAAACG	83
	FaPRE1_3'UTR_Rv	GAGCTCTTGTCTAAGATGGGGTA		
RNAi construct		FaPRE1up-RNAi	AAGGGTACCACACTACATAATACTCTAGCTTGCTCA	626
		FaPRE1low-RNAi	CCTGGATCCCTAGTGCAAAAGCTCTTTATTAATC	
<i>FaPRE2</i>	FaPRE2_3'UTR	FaPRE2_3'UTR_Fw	CAAGCACCGGTAATGAGCA	119
		FaPRE2_3'UTR_Rv	TTTGTAGCTAGTGCAGGCTCC	
<i>FaPRE3</i>	FaPRE3_3'UTR	FaPRE3_3'UTR_Fw	CGACGATCCGCATAACTA	120
		FaPRE3_3'UTR_Rv	GGCTAATGAGCAAACCTAGC	
<i>FaNCED1</i>	qRT-PCR	FaNCED1up	GAGCTTGAAGAGTGTGTGTCGGAAA	172
		FaNCED1low	CGGTTCCAGCAATGGCGAGATAAGCATA	
<i>Intersacer 26S-18S</i>	qRT-PCR	413fw	ACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCG	151
		413rv	TACTGCGGTCCGCAATCGGACG	
<i>gene28407</i>	qRT-PCR	28407qRT-UP	GAAGCTGTAGCTTCCCTT	210
		28407qRT-LOW	AGCACCAAGGTTCTCAACA	
<i>gene18229</i>	qRT-PCR	18229qRT-UP	GGCTAAAACCCGGCATTG	229
		18229qRT-LOW	TCTTGGGTGGACTGAGTTGA	
<i>gene21391</i>	qRT-PCR	21391qRT-UP	TTTCATCTGCGCGATCAGTC	197
		21391qRT-LOW	ACCTTCCCAAACTGTATCCGC	
<i>gene14837</i>	qRT-PCR	14837qRT-UP	ACAGTGCCTGAGGTTTCAGT	226
		14837qRT-LOW	AAGGCCAGGAAGATTGCTC	
<i>gene14266</i>	qRT-PCR	14266qRT-UP	CACCGATCTTAGGAGCGGAC	181
		14266qRT-LOW	AGCAGCTTTATCAGCCCAACA	
<i>FaAAT2</i>	qRT-PCR	FaAAT2qRT-UP	GAAGACGACGCCAAATCTC	224
		FaAAT2qRT-LOW	GCTCCGGTCTAGTCCAAATGTT	
<i>FaAAT1</i>	qRT-PCR	FaAAT1qRT-UP	ACAAGCTTACCTGCTCGAC	221
		FaAAT1qRT-LOW	TGATGCTGAGGTTGAGGAT	
<i>gene24674</i>	qRT-PCR	24674qRT-UP	TGTTCCACTCACTACTCTC	163
		24674qRT-LOW	AGCGGTTTTCGGATGCTGAG	
<i>gene24941</i>	qRT-PCR	24941qRT-UP	CACCGGAGACTGAGCAACAT	211
		24941qRT-LOW	TGACTCGCAGTGCCATCATT	
<i>gene31413</i>	qRT-PCR	31413qRT-UP	CGGCTTCAATAGCAGAAAGCA	186
		31413qRT-LOW	GAGCTTGTGCTGGTGGCTGTT	
<i>gene28720</i>	qRT-PCR	28720qRT-UP	CGACAGAAGGCACTCAAGAA	223
		28720qRT-LOW	GGTCCCGAATCTCCCAAAA	
<i>gene04424</i>	qRT-PCR	04424qRT-UP	GTGTCCTGCTTCCGATCC	190
		04424qRT-LOW	TATTTCCGGTGTTCGGTGGG	
<i>gene18656</i>	qRT-PCR	18656qRT-UP	GCAGAGTACTTTGGACTTGA	203
		18656qRT-LOW	AGACCAAAAATTCACCACCT	
<i>gene28435</i>	qRT-PCR	28435qRT-UP	ATCAAGCAAGGTGATCAGAG	249
		28435qRT-LOW	CATAGACCAGAGATCCCTCA	
<i>gene14611</i>	qRT-PCR	14611qRT-UP	GCGTTTCCAGATTGTGAT	199
		14611qRT-LOW	TAAATGGCTGGAACAGTGA	
<i>gene23367</i>	qRT-PCR	23367qRT-UP	GAATTGTGTTGCCATTGGGA	148
		23367qRT-LOW	CGTCAATGATCCATTGGTGT	
<i>gene26825</i>	qRT-PCR	26825qRT-UP	TGCTTTCAGAAAATCAAAATGG	164
		26825qRT-LOW	AGATTTGTCACTGTTGGTGT	
<i>gene20725</i>	qRT-PCR	20725qRT-UP	AGGCCAAGAAACATCCAA	174
		20725qRT-LOW	AGTCTTCAATGAGGATTTT	
<i>gene18732</i>	qRT-PCR	18732qRT-UP	CGATGTTCAAATGCTCTGTC	212
		18732qRT-LOW	CTCCTTTGTTAAGAGCTCCA	
<i>gene09427</i>	qRT-PCR	09427qRT-UP	GATGAGACATGGAAGGACAA	172
		09427qRT-LOW	CTAGTGGTCTAGTGGAGCAG	
<i>gene29482</i>	qRT-PCR	29482qRT-UP	GAGCATCTGGGTCTATAGC	217
		29482qRT-LOW	TCCACTATTACATCAGGAGC	
<i>gene25260</i>	qRT-PCR	25260qRT-UP	CTGGGTCCACATTAGTCAA	217
		25260qRT-LOW	GTTTGGCTTGAACAGAGCAA	
<i>gene13540</i>	qRT-PCR	13540qRT-UP	AAATGCCAAAGAGCGACTTA	173
		13540qRT-LOW	GCTTCTTAAACGACAAGAGC	
<i>FaRGLyase1</i>	qRT-PCR	RGLqRT-UP	CCTTGATCGTACTACTATGG	189
		RGLqRT-LOW	ATCCAACTATACCGCAACTT	
<i>gene21638</i>	qRT-PCR	21638qRT-UP	AATTCTCAAAGACCAACGTTG	233
		21638qRT-LOW	TAACCTACTTGGCTTGTGT	
<i>gene03442</i>	qRT-PCR	03442qRT-UP	GGCCACTATACATCTGGAG	249
		03442qRT-LOW	GAGGTACTGTTTCAGTGTGT	
<i>gene23967</i>	qRT-PCR	23967qRT-UP	TTCTTTGGAAGATGTGCGCA	227
		23967qRT-LOW	CCCATTCAAAAGCATTAGCAG	
<i>FaGA2ox3</i>	qRT-PCR	FaGA2ox3qRT-UP	TCTCCCAAAATCACTCTCCA	71
		FaGA2ox3qRT-LOW	TAATCTCAACAGCGGAAGCTG	

## RNA isolation

Total RNA was isolated from three independent pools (10 fruits per pool) of strawberry fruits at different development stages and plant vegetative tissues following the indications of (Asif *et al.*, 2000). When strawberry fruits were used, the achenes were always removed before extracting the RNA from the samples. In any case, the RNA extracted was always incubated with DNase I (RNase free) (Invitrogen) to eliminate the genomic DNA contamination following manufacturer's instructions. The RNA quality and integrity were checked using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Deutschland). Only samples with a RIN value  $\geq 8$  were used for subsequent transcriptomic analyses.

## Microarray generation and analysis

The transcriptomic changes produced by the *FaPRE1* silencing were determined using a custom-made oligo microarray platform (60-mer length; FraGenomics 35k) containing a total of 34.616 singletons corresponding to those sequences published in the strawberry genome project



(<http://www.strawberry.org>). We compared the transcriptomes from control red receptacles injected with the empty pFRN vector *versus* red receptacles injected with the RNAi-*FaPRE1* construct. The same microarray platform was also used for the transcriptomic analysis of the strawberry ripening fruit process comparing the transcriptomes from green (G1) receptacle *versus* red (R) receptacle (Medina-Puche *et al.*, 2016). The corresponding data were deposited in the GEO database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) with the GSE125995 for silencing data and GSE126220 for ripening data (Medina-Puche *et al.*, 2016). The criteria for the selection of the differentially expressed genes were  $\log_2$  fold change  $> \pm 2$  and  $p \leq 0.05$  in both analyses. The microarray characteristics, hybridization and processing conditions were as described in (Medina-Puche *et al.*, 2015)

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

Expression analyses of the genes herein studied in different physiological conditions and for microarray validation were performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using iCycler system (BioRad), as previously described by (Benítez-Burraco *et al.*, 2003) and (Medina-Puche *et al.*, 2014). Specific primers of the 3'UTR regions were designed to analyze the expression of the *PRE*-like genes (*FaPRE1*, *FaPRE2* and *FaPRE3*) identified in the strawberry genome. Besides, to validate the expression data obtained in the microarray analysis, specific primers were designed on several genes that showed differential expression in the experimental situations analyzed. Table 5 depicts the primer sequences used for all quantitative amplifications. The relative increase or decrease of gene expression in the samples in comparison to that in the control gene was calculated in accordance with (Pedersen and Amtssygehus, 2001). Interspacer 26S–18S gene was selected as control gene owing to its constitutive expression.

### **Statistical analysis of data.**

Statistical significance was tested with a Student's *t*-test using SPSS software.

### **Abbreviations**

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; ABA, abscisic acid; bHLH, basic helix-loop-helix; dABA, deuterated abscisic acid; CDS, coding DNA sequence; DAPI, 4'-diamino-2-phenylindole dihydrochloride; G1, Green1 stage; G2, Green2 stage; G3, Green3 stage; W, White stage; R, Ripe stage; OR, Overripe stage; SN, Senescent stage (the seven subjective stages of strawberry fruit development); GA<sub>3</sub>, gibberellic acid; GFP, green fluorescent protein; HLH, helix-loop-helix; NCED, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; PBZ, paclobutrazol; PRE1, paclobutrazol resistance 1; qRT-PCR, quantitative real time PCR; RNAi, RNA interference.

**Availability of data and materials**

The datasets generated and analyzed during the current study are available in the GEO repository ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) (GSE125995 for silencing data and GSE126220 for ripening data). The data are public from October 18, 2019.

## References

- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., et al.** (2000) Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *Plant Cell*, **12**, 647. Available at: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3870992?origin=crossref>.
- Almeida, J.R., D'Amico, E., Preuss, A., et al.** (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**, 61–71. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986107002317>.
- Araguez, I., Osorio, S., Hoffmann, T., Rambla, J.L., Medina-Escobar, N., Granell, A., Botella, M.A., Schwab, W. and Valpuesta, V.** (2013) Eugenol Production in Achenes and Receptacles of Strawberry Fruits Is Catalyzed by Synthases Exhibiting Distinct Kinetics. *Plant Physiol.*, **163**, 946–958. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.224352>.
- 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. Report.*, **18**, 109–115.
- Bai, M.-Y., Fan, M., Oh, E. and Wang, Z.-Y.** (2012) A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**, 4917–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221598>.
- Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J.A., Quesada, M.A. and Pliego-Alfaro, F.** (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, **54**, 29–36. Available at: <http://www.banglajol.info/index.php/PTCB/article/view/6888>.
- Barnes, W.J. and Anderson, C.T.** (2018) Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. *Mol. Plant*, **11**, 31–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28859907>.
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L. and Muñoz-Blanco, J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.*, **54**, 633–645.
- Blanco-Portales, R., Medina-Escobar, N., López-Ráez, J.A., González-Reyes, J.A., Villalba, J.M., Moyano, E., Caballero, J. and Muñoz-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**, 1723–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147722>.
- BUTCHER, D.N., CLARK, J.A. and LENTON, J.R.** (1990) Gibberellins and the Growth of Excised Tomato Roots: Comparison of gib-1 Mutant and Wild Type and Responses to Applied GA 3 and 2 S , 3 S Paclobutrazol. *J. Exp. Bot.*, **41**, 715–722. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/41.6.715>.
- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J.F., Bilbao-Castro, J.R. and Robertson, D.L.** (2010) Genome-Wide Classification and Evolutionary Analysis of the bHLH Family of Transcription Factors in Arabidopsis, Poplar, Rice, Moss, and Algae. *Plant Physiol.*, **153**, 1398–1412. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.153593>.
- Castelain, M., Hir, R. Le and Bellini, C.** (2012) The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in Arabidopsis.

*Physiol. Plant.*, **145**, 450–460. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2012.01600.x>.

**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.

**Chen, J., Liu, D., Jiang, Y., Zhao, M., Shan, W., Kuang, J. and Lu, W.** (2011) Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS One*, **6**, e24649. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915355>.

**Chen, K.-Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J. and Tanksley, S.D.** (2007) Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science (80-. )*, **318**, 643–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962563>.

**Chen, L., Liu, Y., Liu, H., Kang, L., Geng, J., Gai, Y., Ding, Y., Sun, H. and Li, Y.** (2015) Identification and expression analysis of MATE genes involved in flavonoid transport in blueberry plants. *PLoS One*, **10**, e0118578. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25781331>.

**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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.99.3.1258>.

**Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., et al.** (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytol.*, **191**, 376–390.

**Cui, J., You, C., Zhu, E., Huang, Q., Ma, H. and Chang, F.** (2016) Feedback Regulation of DYT1 by Interactions with Downstream bHLH Factors Promotes DYT1 Nuclear Localization and Anther Development. *Plant Cell*, **28**, 1078–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113773>.

**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. *J. Exp. Bot.*, **63**, 4275–4290. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers120>.

**Daminato, M., Guzzo, F. and 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**, 3775–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888065>.

**Edger, P.P., Poorten, T.J., VanBuren, R., et al.** (2019) Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.*, **51**, 541–547. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-019-0356-4>.

**Fu, X., Cheng, S., Zhang, Y., et al.** (2017) Differential responses of four biosynthetic pathways of aroma compounds in postharvest strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) under interaction of light and temperature. *Food Chem.*, **221**, 356–364. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616317356>.

**Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z. and Wang, Z.-Y.** (2012) Interactions between HLH and bHLH Factors Modulate Light-Regulated Plant Development. *Mol. Plant*, **5**, 688–697. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205214600174>.

**Heang, D. and Sassa, H.** (2012a) An atypical bHLH protein encoded by POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 2 is involved in controlling grain length and weight of rice through interaction with a typical bHLH protein APG. *Breed. Sci.*, **62**, 133–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136524>.

**Heang, D. and Sassa, H.** (2012b) Antagonistic actions of HLH/bHLH proteins are involved in grain length

- and weight in rice. *PLoS One*, **7**, e31325. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363621>.
- Hernandez, J.M., Feller, A., Morohashi, K., Frame, K. and Grotewold, E.** (2007) The basic helix loop helix domain of maize R links transcriptional regulation and histone modifications by recruitment of an EMSY-related factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 17222–17227. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705629104>.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., et al.** (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol. Cell*, **10**, 509–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408820>.
- Hoffmann, T., Kalinowski, G. and 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**, 818–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092319>.
- Hyun, Y. and Lee, I.** (2006) KIDARI, Encoding a Non-DNA Binding bHLH Protein, Represses Light Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **61**, 283–296. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11103-006-0010-2>.
- Ikeda, M., Fujiwara, S., Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2012) A Triantagonistic Basic Helix-Loop-Helix System Regulates Cell Elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 4483–4497. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.105023>.
- Ikeda, M., Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2013) ATBS1 INTERACTING FACTORS negatively regulate *Arabidopsis* cell elongation in the triantagonistic bHLH system. *Plant Signal. Behav.*, **8**, e23448. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.23448>.
- Jang, S., An, G. and Li, H.-Y.** (2017) Rice Leaf Angle and Grain Size Are Affected by the OsBUL1 Transcriptional Activator Complex. *Plant Physiol.*, **173**, 688–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27879391>.
- 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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.111.177311>.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992820>.
- Kim, Y., Song, J.-H., Park, S.-U., Jeong, Y.-S. and Kim, S.-H.** (2017) Brassinosteroid-Induced Transcriptional Repression and Dephosphorylation-Dependent Protein Degradation Negatively Regulate BIN2-Interacting AIF2 (a BR Signaling-Negative Regulator) bHLH Transcription Factor. *Plant Cell Physiol. cell Physiol.*, **58**, 227–239. Available at: <https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pcw223>.
- Koyama, K., Sadamatsu, K. and Goto-Yamamoto, N.** (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct. Integr. Genomics*, **10**, 367–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841954>.
- Lee, Sumin, Lee, Seunghye, Yang, K.-Y., Kim, Y.-M., Park, S.-Y., Kim, S.Y. and Soh, M.-S.** (2006) Overexpression of PRE1 and its Homologous Genes Activates Gibberellin-dependent Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 591–600. Available at: <http://academic.oup.com/pcp/article/47/5/591/1844154/Overexpression-of-PRE1-and-its-Homologous->

Genes.

**Li, Y., Wei, W., Feng, J., Luo, H., Pi, M., Liu, Z. and Kang, C.** (2017) Genome re-annotation of the wild strawberry *Fragaria vesca* using extensive Illumina- and SMRT-based RNA-seq datasets. *DNA Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29036429>.

**Lu, R., Zhang, J., Liu, D., Wei, Y.-L., Wang, Y. and Li, X.-B.** (2018) Characterization of bHLH/HLH genes that are involved in brassinosteroid (BR) signaling in fiber development of cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Plant Biol.*, **18**, 304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30482177>.

**Mara, C.D., Huang, T. and Irish, V.F.** (2010) The Arabidopsis floral homeotic proteins APETALA3 and PISTILLATA negatively regulate the BANQUO genes implicated in light signaling. *Plant Cell*, **22**, 690–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305124>.

**Massari, M.E. and Murre, C.** (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 429–440. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.20.2.429-440.2000>.

**Medina-Puche, L., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Cumplido-Laso, G., García-Caparrós, N., Moyano-Cañete, E., Caballero-Repullo, J.L., Muñoz-Blanco, J. and Rodríguez-Franco, A.** (2016) Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Funct. Integr. Genomics*, **16**, 671–692. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-016-0510-3>.

**Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., et al.** (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, F.J., Boersma, M., et al.** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiol.*, **168**, 598–614. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931522>.

**Molina-Hidalgo, F.J., Franco, A.R., Villatoro, C., et al.** (2013) The strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1471–1483.

**Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Cañete-Gómez, C., et al.** (2017) The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J. Exp. Bot.*, **68**, 4529–4543. Available at: <http://academic.oup.com/jxb/article/68/16/4529/4067750/The-fruit-specific-transcription-factor-FaDOF2>.

**Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Gelis, S., et al.** (2015) Functional characterization of FaNIP1;1 gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Sci.*, **238**, 198–211.

**Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R.A., Sun, Y. and Wang, Z.-Y.** (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *Elife*, **3**. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867218>.

**Pedersen, S. and Amtssygehus, A.** (2001) Multiplex Relative Gene Expression Analysis by Real-Time RT-PCR Using the iCycler iQ Detection System. *BioRadiations*, **107**, 10–11. Available at: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_2696.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2696.pdf).

**Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In *Horticultural Reviews*. Oxford,

UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 267–297. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650585.ch8>.

**Pillet, J., Yu, H.-W., Chambers, A.H., Whitaker, V.M. and Folta, K.M.** (2015) Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *J. Exp. Bot.*, **66**, 4455–4467. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979996>.

**Quesada, M.A., Blanco-Portales, R., Pose, S., et al.** (2009) Antisense Down-Regulation of the FaPG1 Gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening. *Plant Physiol.*, **150**, 1022–1032. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.138297>.

**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**, 1023–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517758>.

**Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portolés, S., Rodríguez-Concepción, M. and Martínez-García, J.F.** (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J.*, **26**, 4756–4767. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601890>.

**Salvatierra, A., Pimentel, P., Moya-León, M.A. and Herrera, R.** (2013) Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry*, **90**, 25–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522932>.

**Schaart, J.G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., et al.** (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol.*, **197**, 454–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157553>.

**Shin, K., Lee, I., Kim, E., Park, S., Soh, M.-S. and Lee, S.** (2019) PACLOBUTRAZOL-RESISTANCE Gene Family Regulates Floral Organ Growth with Unequal Genetic Redundancy in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 869. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/869>.

**Shulaev, V., Sargent, D.J., Crowhurst, R.N., et al.** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.*, **43**, 109–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186353>.

**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**, 4741–50. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err313>.

**Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P.H.** (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, **15**, 1749–70. Available at: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.013839>.

**Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., et al.** (2015) Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytol.*, **208**, 482–496.

**Wang, H., Zhu, Y., Fujioka, S., Asami, T., Li, Jiayang and Li, Jianming** (2009) Regulation of Arabidopsis brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *Plant Cell*, **21**, 3781–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023194>.

**Wang, M., Yang, D., Ma, F., Zhu, M., Shi, Z. and Miao, X.** (2019) OsHLH61-OsbHLH96 influences

rice defense to brown planthopper through regulating the pathogen-related genes. *Rice (N. Y.)*, **12**, 9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796564>.

**Wei, K. and Chen, H.** (2018) Comparative functional genomics analysis of bHLH gene family in rice, maize and wheat. *BMC Plant Biol.*, **18**, 309. Available at: <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-018-1529-5>.

**Wei, L., Mao, W., Jia, M., et al.** (2018) FaMYB44.2, a transcriptional repressor, negatively regulates sucrose accumulation in strawberry receptacles through interplay with FaMYB10. *J. Exp. Bot.*, **69**, 4805–4820. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article/69/20/4805/5063657>.

**Xu, Z., Liu, X., He, X., Xu, L., Huang, Y., Shao, H., Zhang, D., Tang, B. and Ma, H.** (2017) The Soybean Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor ORG3-Like Enhances Cadmium Tolerance via Increased Iron and Reduced Cadmium Uptake and Transport from Roots to Shoots. *Front. Plant Sci.*

**Zhang, C., Feng, R., Ma, R., Shen, Z., Cai, Z., Song, Z., Peng, B. and Yu, M.** (2018) Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix superfamily members in peach Y. Han, ed. *PLoS One*, **13**, e0195974. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195974>.

**Zhang, L.-Y., Bai, M.-Y., Wu, J., et al.** (2009) Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and Arabidopsis. *Plant Cell*, **21**, 3767–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009022>.

**Zhang, Y., Yin, X., Xiao, Y., et al.** (2018) An ETHYLENE RESPONSE FACTOR-MYB Transcription Complex Regulates Furaneol Biosynthesis by Activating QUINONE OXIDOREDUCTASE Expression in Strawberry. *Plant Physiol.*, pp.00598.2018. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.18.00598>.

**Zhao, F., Li, G., Hu, P., Zhao, X., Li, L., Wei, W., Feng, J. and Zhou, H.** (2018) Identification of basic/helix-loop-helix transcription factors reveals candidate genes involved in anthocyanin biosynthesis from the strawberry white-flesh mutant. *Sci. Rep.*, **8**, 2721. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-21136-z>.

**Zheng, K., Wang, Y. and Wang, S.** (2019) The non-DNA binding bHLH transcription factor Paclobutrazol Resistances are involved in the regulation of ABA and salt responses in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.*, **139**, 239–245. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30921735>.

**Zhu, Z., Chen, G., Guo, X., Yin, W., Yu, X., Hu, J. and Hu, Z.** (2017) Overexpression of SIPRE2, an atypical bHLH transcription factor, affects plant morphology and fruit pigment accumulation in tomato. *Sci. Rep.*, **7**, 5786. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04092-y>.

**Zhu, Z., Liang, H., Chen, G., Li, F., Wang, Y., Liao, C. and Hu, Z.** (2019) The bHLH transcription factor SIPRE2 regulates tomato fruit development and modulates plant response to gibberellin. *Plant Cell Rep.* Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-019-02425-x>



**Additional Files legends:**

**Additional file 1:** Subfamily classification of 182 plant bHLH/HLH sequences examined in this study and additional information.

**Data available on the electronic version of the thesis.**

**Additional file 2.** Total microarray data from transcriptomic comparison between transgenic receptacles agroinfiltrated with *FaPRE1*-RNAi construct and no-transgenic control receptacles. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011).

**Data available on the electronic version of the thesis.**

**Additional file 3:** All the genes down-regulated in strawberry *FaPRE1*-RNAi receptacles (fold change RNAi) and up-regulated in strawberry red receptacle (fold ripening). Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011)

**Data available on the electronic version of the thesis.**

**Additional file 4:** All the genes up-regulated in strawberry *FaPRE1*-RNAi receptacles (fold change RNAi) and down-regulated in strawberry red receptacle (fold ripening). Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011)

**Data available on the electronic version of the thesis.**



## **CHAPTER 2**

### **The R2R3-MYB transcription factor FaMYB123 regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit**

This chapter has been submitted to *Plant Journal* as:

**Martinez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Serratos MP, Ric-Varas P, Medina-Puche L, Moyano L, Mercado JA, Alseekh S, Caballero JL, Rodríguez-Franco A, Fernie AR, Muñoz-Blanco J, Molina-Hidalgo FJ. 2021. The R2R3-MYB transcription factor FaMYB123 regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit.

## **The R2R3-MYB transcription factor FaMYB123 regulates anthocyanin and flavonol biosynthesis in strawberry fruit**

### **Abstract**

Using transcriptomics approaches, we have identified and functionally characterized an R2R3 MYB transcription factor, FaMYB123, whose expression is ripening-related, receptacle-specific and hormonally regulated by both abscisic acid and auxin. When *FaMYB123* expression was knocked down by RNAi in ripe strawberry fruit receptacles, the expression of genes that encode enzymes involved in the final steps of anthocyanin/flavonoid biosynthesis were down regulated. These fruits showed a concomitant decrease in total anthocyanin and flavonoid content, noticeable in the malonyl derivatives. Additionally, metabolomic results showed an accumulation of proanthocyanin, propelargonidins and other condensed tannins, mainly related to green receptacles, in the transgenic receptacles. These results confirm that FaMYB123 is a transcription factor involved in the anthocyanin/flavonoid production in ripe fruit receptacles along the ripening stages, regulating key enzymes of these pathways, such as *FaANS*, *FaUFGT* and *FaMalTransf*. These results provide evidence that *FaMYB123* plays a regulatory role in late steps of phenylpropanoid pathway.

## Introduction

Agriculturally, strawberry fruit is one of the most consumed berries world-wide. Its fruits are highly appreciated by the consumer, because of the sweetness and complex aroma, flavour, colour, and firmness that constitute the fruit quality traits. Besides, strawberry fruits are a rich source of a wide variety of nutritive compounds such as sugars, vitamins, minerals, and non-nutritive but bioactive and health conferring compounds such as flavonoids, anthocyanins and phenolic acids. (Giampieri *et al.*, 2012). These compounds exert a synergistic and cumulative effect on the promotion of human health and in disease prevention. Lately, the effect of the compounds contained in strawberries are being studied in detail in relation to their effects on human health. The protective effects of strawberry consumption comprise a wide range of biological activities in the prevention of inflammation, cardiovascular diseases, obesity, metabolic syndrome, certain types of cancers and even neurological diseases (Giampieri *et al.*, 2015).

Strawberry is a non-climacteric fruit whose growth and ripening are regulated by the antagonistic relationship between auxins and ABA (Perkins Veazie, 1995; Li *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012, Medina-Puche *et al.*, 2016). Along the ripening process, ABA biosynthetic pathway is activated, resulting in an increase of ABA concentration in ripe fruits (Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). *FaNCED1* that encodes a 9- cis-epoxycarotenoid dioxygenase is responsible of the increase of ABA content in red ripen fruits (Jia *et al.*, 2012; Medina-Puche *et al.*, 2014). Furthermore, previous transcriptomic studies have demonstrated that the expression of those genes related to the main organoleptic characteristics of the fruit are ABA-dependent (Medina-Puche *et al.*, 2016). In plants, the increase of ABA triggers a three-step signal that depend through its binding and activation of the binary complex RCAR/PYR/PYL ABA receptors and PPC2 phosphatases, that function as coreceptor. Activation of RCAR receptor inactive PPC2 causing an activation of the kinase SnRK2, that phosphorylate ABA-responsive transcriptional factors which in turn activates the expression of ABA responsive genes (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2019). In strawberry fruits, it has been previously reported that an ABA perception and signalling orthologous core complex is operative (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011, 2013; Hang *et al.*, 2015). Substantial evidence has demonstrated the regulatory role played by the intracellular sucrose, acting as a signal molecule and regulating the ripening process (Jia *et al.*, 2013). This regulatory function seems to be contested through the action of the FaSUT1 transporter (Jia *et al.*, 2013). Similarly, Luo *et al.*, (2019) demonstrated the synergistic action between the content of ABA and sucrose on the co-regulation of strawberry fruit ripening.

DNA-binding transcription factors (TFs) are essential as master regulatory genes, controlling the network responsible for specific gene expression. These genes would determine the spatiotemporal expression of other genes, according to additive and cooperative mechanism in gene regulation. To carry out their specific and dynamic function, TFs often interact with others TFs, either on the same promoter in a cooperative, additive, or in a combinatorial fashion (Bemer *et al.*, 2017). MYBs are a large family of TFs found in all eukaryotic organisms and characterized by one or more repeats of the MYB domain (Lipsick, 1996; Kranz *et al.*, 2000). R2R3 MYBs are recognisable by their two imperfect MYB repeats that follow the R2 and R3 structure of the c-MYB (Kranz *et al.*, 2000). To play its regulatory role, MYB TFs interact with other TFs and proteins involved in the transcription process. In example, the formation of a MBW complex, composed by MYB and bHLH TFs in combination with WD40 proteins are important to target gene regulation in different metabolic and developmental pathways such as flavonoid accumulation, glucosinolate production and trichome production (Xie *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2015; Matías-Hernández *et al.*, 2017). MYB-bHLH complexes recognize some *cis* elements on the promoter of those genes that regulate, determining in this way target gene specificity (Lai *et al.*, 2014; Bemer *et al.*, 2017). Interestingly, it has been demonstrated that the bHLH TFs can be responsible for the responses to environmental and hormonal signals via their interaction with different proteins (Pireyre and Burow, 2015). WD40 proteins are important for stabilization of MBW complexes, however it is not clear that these proteins interact with both MYB or bHLH TFs in MBW complexes. MYB TFs, are some of the TFs that present, on the promoters of genes that regulate, a high degree of interaction with member of other TFs through cross-family interactions. This is why they are considered as “hubs” TFs (Bemer *et al.*, 2017)

Some MYB and bHLH genes, have also been functionally described in strawberry. The role of *FaMYB1* as repressor of structural genes of the phenylpropanoid/flavonoids/anthocyanins pathway has been determined (Aharoni *et al.*, 2001). Also, the function played by R2R3 *FaMYB10* on the biosynthesis of these compounds in ripe receptacles was demonstrated. Its function proceeds through the activation of structural genes of this pathway in ripe fruit receptacles (Lin-Wang *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2014). Additionally, it has been reported that *FaMYB10* may also regulate expression of structural genes belonging to the biosynthetic pathway that produces phenylpropanoid volatiles (Medina-Puche *et al.*, 2014). The positive synergistic action between another R2R3 MYB TF, *FaEOBII* and *FaDOF2* on the regulation of the metabolic pathway involved in the production of phenylpropanoid volatile eugenol was also demonstrated (Medina-Puche *et al.*, 2015; Molina-Hidalgo *et al.*, 2017). Both, *FaEOBII* and *FaDOF2* expression are under the regulation of *FaMYB10*. On the other hand, four TFs, *FaMYB9*/*FaMYB11*, *FaBHLH3* and *FaTTG1*, have been described as positive regulators of

proanthocyanin biosynthesis, with these compounds representing the main flavonoids produced in unripe strawberry (Schaart *et al.*, 2013).

In strawberry fruits, the functional role of few TFs involved in ripening has been elucidated. The function of MADS TFs such as *FaSHP* (Daminato *et al.*, 2013) and *FaMADS9* (Vallarino *et al.*, 2020) has been determined. Two AP2/ERF TFs have been described, one of them, *FaERF9* acts synergistically with *FaMYB98* to activate *FaQR* a quinone reductase, key gene on the furaneol biosynthesis (Zhang *et al.*, 2018). *FaRAVI* has been related as a regulator on the *FaMYB10* expression, regulating the phenylpropanoid pathway (Zhang *et al.*, 2020). In this way, *FaTCP11* regulates flavonol biosynthesis, controlling the expression of leucoantocyanidin reductase, (*FaLAR*) and flavonol-3'-hydroxylase (*FaF3'H*). By contrary, *FaSCL8*, regulates the expression of genes related to phenylpropanoid biosynthesis, like phenylammonia lyase (*FaPAL*) as well as chalcone synthase and isomerase (*FaCHS*, *FaCHI*) (Pillet *et al.*, 2015).

Previous transcriptomic analyses performed in our research group allowed us to identify several TFs whose expression differentially changed throughout strawberry fruit receptacle development and ripening (Medina-Puche *et al.*, 2016). This study allows us to detect a ripening-related R2R3 MYB TF (gene 25060, FvH4\_5g32460), hereinafter *FaMYB123*, that presents a clear fruit specific and ripening related expression-pattern. Molecular and physiological studies show that this TF is involved in the regulation of structural genes of the anthocyanins or flavonols that accumulate in ripen fruit receptacles.

## Results

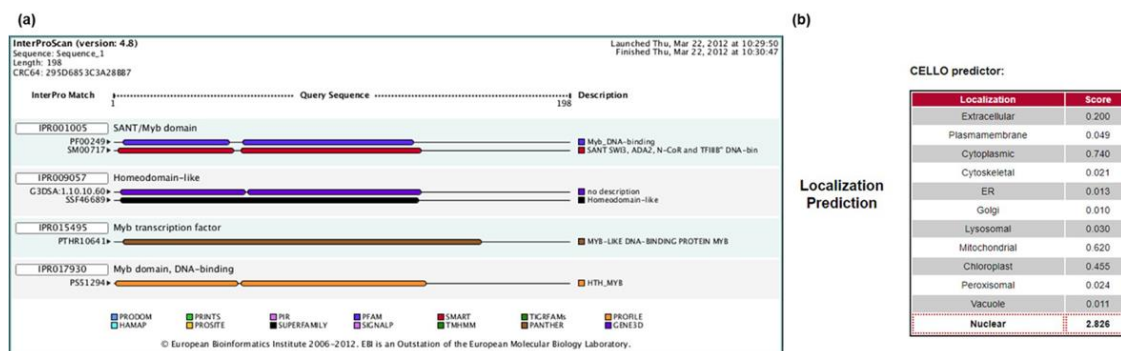
Previous transcriptomic studies performed in our research group (Medina-Puche *et al.*, 2016), where we compared the transcriptomes of green (G2-stage) and full red-ripe strawberry fruit receptacles (R-stage) and the transcriptomic changes under hormonal conditions (ABA and auxin treatments), gave rise to a group of genes with potential interest for further functional characterizations. Among the TFs identified, only three MYB-type were up-regulated in red-ripe receptacle and regulated positively by ABA and negatively by auxins, suggesting that they are involved in different fruit receptacle ripening-related processes. These were *FaMYB10* (gene31413, FvH4\_1g22020), *FaEOBII* (gene28435, FvH4\_6g50930) and *FaMYB123* (gene25060, FvH4\_5g32460). *FaMYB10* and *FaEOBII* were characterized in (Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015) respectively, demonstrating the main role played by both TFs on controlling major processes during ripening. In this work, we have proceeded to functionally characterize the MYB TF corresponding to *gene25060*, hereinafter *FaMYB123*,



whose expression pattern indicates that could be related with the organoleptic properties that take part in the ripening process of strawberry.

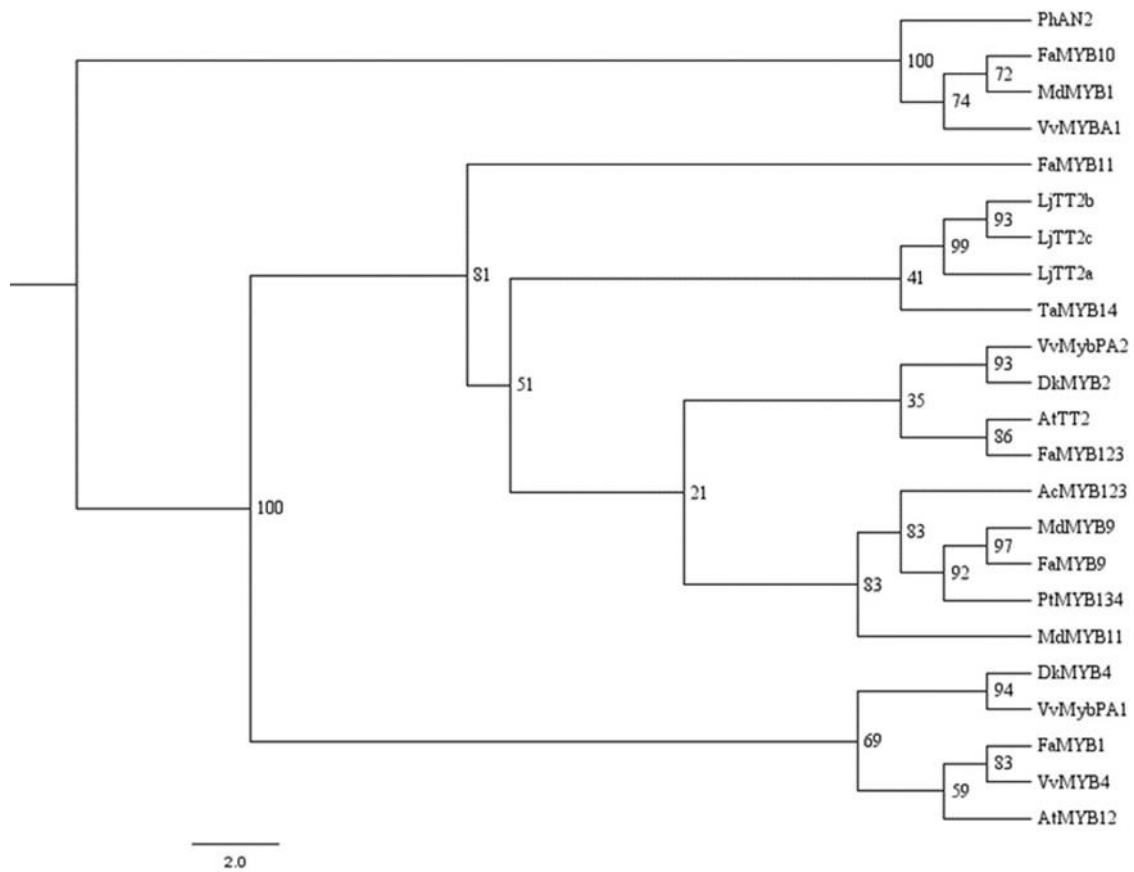
### Sequence and phylogenetic analysis of the FaMYB123

The full-length cDNA sequence of the *FaMYB123* gene was amplified from *Fragaria × ananassa* cv Camarosa. The *in-silico* analysis of the predicted FaMYB123 protein showed the R2 and R3 motifs at the N-terminus, that characterize the R2R3 DNA-binding MYB proteins, and determine the interaction with cis-regulatory sequences in the promoters (Fig 1A).

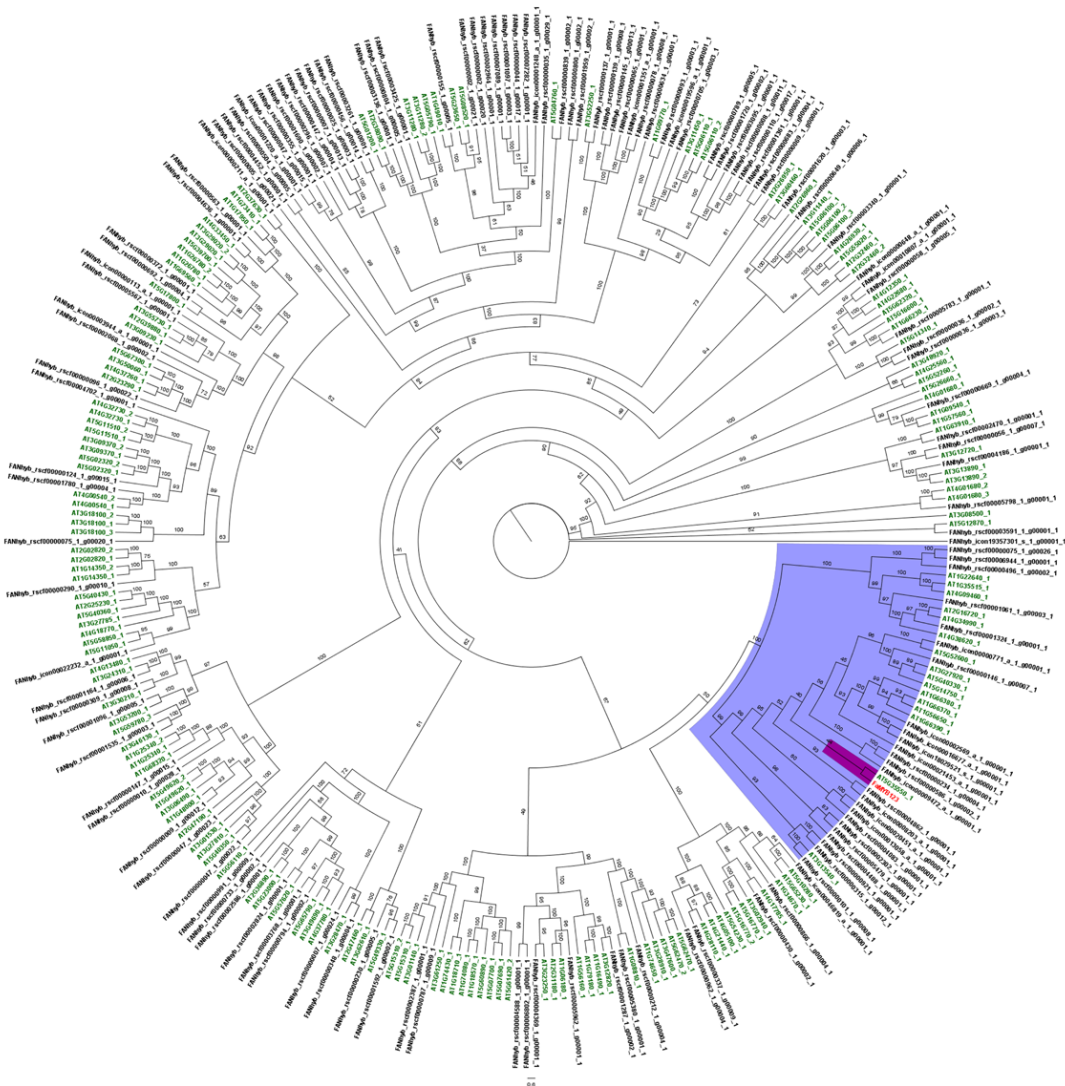


**Fig 1.** (a). Predicted domains in FaMYB123 protein using interpro program. (b). Screenshot of predicted subcellular localization of FaMYB123 protein using CELLO2Go website.

The corresponding aminoacidic sequence showed significant sequence homology with other MYB proteins from higher plants and among them, the highest homology with AtTT2, VvMYBPA2 and DkMYB2 (Fig 2). A phylogeny of full length predicted proteins from strawberry and *A. thaliana* was generated, showing that FaMYB123 present the highest homology with AtTT2 (Fig 3) (Kranz *et al.*, 1998). These proteins had a functional role regulating both anthocyanin and phenylpropanoid pathways. (Terrier *et al.*, 2009; Appelhagen *et al.*, 2011)



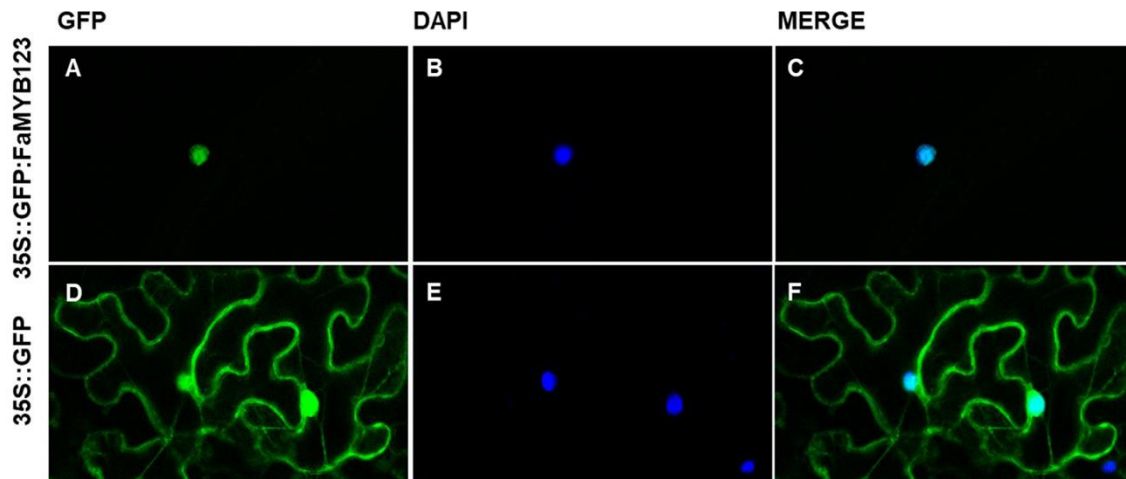
**Fig 2.** Phylogenetic tree of FaMYB123, and its known R2R3 MYB transcription factors. The tree was constructed using the FigTree software by the neighbour-joining method with 1000 bootstrap replicates. Numbers next to each node represent confidence percentages. Genbank accession numbers are FaMYB123 (MW081987) LjTT2a (AB300033.2), LjTT2b (AB300034.2), LjTT2c (AB300035.1), TaMYB14 (JN049641.1), PtMYB134 (FJ573151.1), PhAN2 (AF146702.1), MdMYB1 (DQ886414.1), AtTT2 (NP\_198405.1), VvMybPA1 (AM259485.1), FaMYB10 (EU155162.1), VvMYBPA2 (EU919682.1), DkMYB2 (AB503699.1), AcMYB123 (MH643775) DkMYB4 (AB503701.1), AtMYB12 (DQ224277.1), VvMYB4 (EF113078.1), FaMYB1 (AF401220.1), MdMYB11 (AAZ20431), FaMYB11 (AFL02461), FaMYB9 (AFL02460) MdMYB9 (ABB84757), VvMYBA1 (AB097923.1), and VvMYBA2 (AB097924.1)



**Fig 3.** Phylogenetic tree of MYB transcription factors from *Arabidopsis thaliana* (sequences downloaded from TAIR database) with all *Fragaria × ananassa* proteins (downloaded from plantTFDB database).

### FaMYB123 protein is located in the nucleus

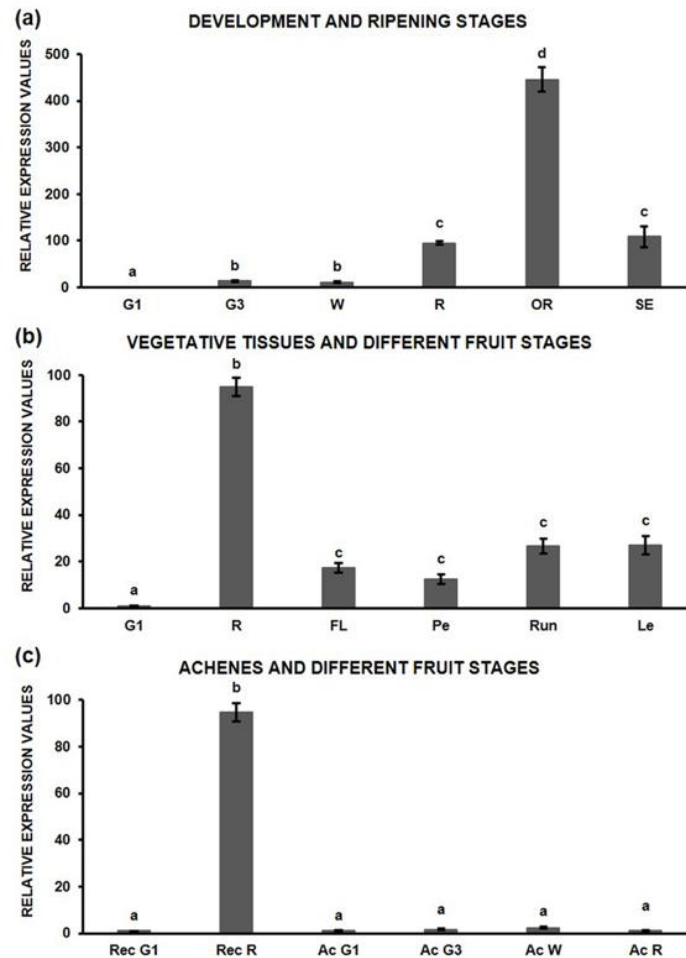
Bioinformatics analyses of FaMYB123 aminoacidic sequence reveal that FaMYB123 was predicted to be located into the nucleus (Fig 1B). This bioinformatic prediction was confirmed by confocal microscopy experiments where the full-length CDS of *FaMYB123* was fused to GFP at N-terminal region (GFP-FaMYB123) under the control of the 35S promoter. Fusion proteins were transiently expressed in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*, and the fluorescent signal was detected exclusively in nucleus and co-localized with nucleic-specific DAPI marker (Fig 4).



**Fig 4.** Subcellular localization of the FaMYB123 protein in *Nicotiana benthamiana* leaves. The *Nicotiana benthamiana* leaves were agroinfiltrated with translational constructs 35S::GFP:FaMYB123 and with 35S::GFP as control. Leaves infiltrated with *Agrobacterium* that carried plasmid 35S::GFP:FaMYB123. (A and C). Infiltrated with 35S::GFP (D and F). GFP: green fluorescent protein; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (nuclei dye); MERGE: merged view of the GFP and DAPI images.

#### ***FaMYB123* expression is strongly expressed in receptacles and hormonally regulated throughout the fruit growth and ripening**

Spatio-temporal expression pattern for *FaMYB123* gene was analysed by qRT-PCR. *FaMYB123* is expressed at low level during fruit development (G1, G3 and W), but it drastically increased its expression at the ripened and senescent stages (R, OR and SE) of receptacle development, reaching the higher level in OR stage (Fig 5A). In vegetative tissues, such as leaves, flowers, petals, or runners, *FaMYB123* was only expressed at a low level (Fig 5B). However, no significant expression was detected in achenes when compared against the expression level observed in red fruit receptacles (Fig 5C). These combined expression results indicate that *FaMYB123* mainly regulates specific ripening-related physiological processes in the fruit receptacle tissue.

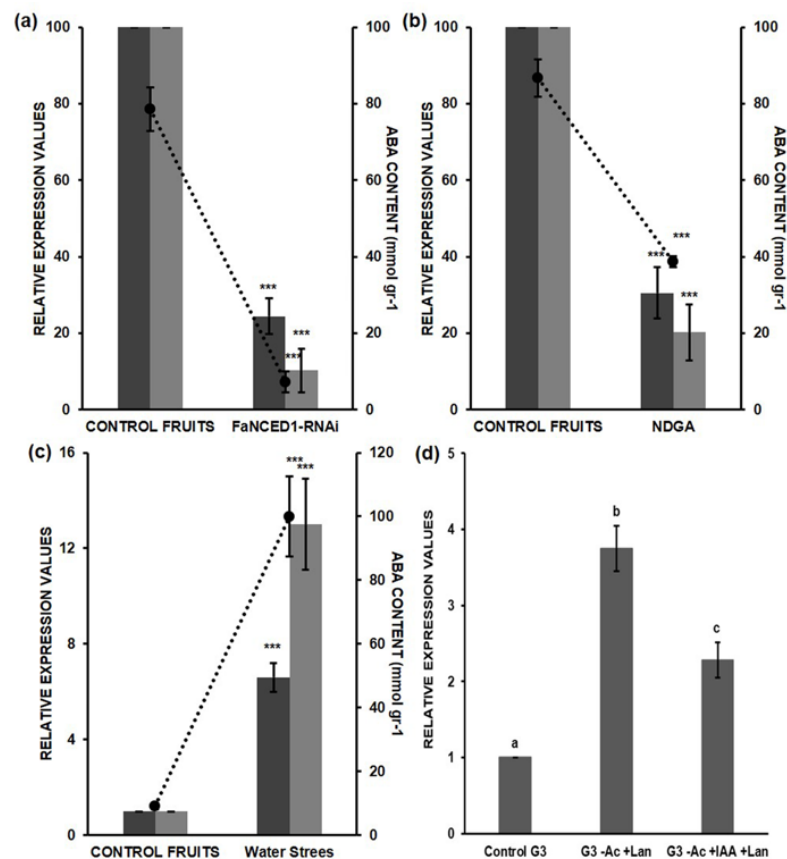


**Fig 5.** (a). Developmental expression of the strawberry *FaMYB123* in fruit receptacle (b). Vegetative tissues vs green1 and red receptacles (c). Achenes vs green1 and red receptacles. of *F. × ananassa* cv. Camarosa. qRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaMYB123* gene. Quantification 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; W: white stage; R: red stage; OR: overripe stage; SE: senescent stage; REC G1: receptacle G1; REC R: receptacle R; FL: flower; Pe: petal; Run: runner; Le: Leaf; Ac G1: achenes small-sized green fruit; Ac G3: achenes full-sized green fruit; Ac W: achenes white stage; Ac R: achenes red stage. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

ABA plays an important role in strawberry fruit ripening regulation (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011) while auxin, produced by achenes, stimulates receptacle growth and subsequently inhibits fruit ripening (Perkins-Veazie, 1995). The expression of the vast majority of ripening-related genes associated to the organoleptic and quality properties of the strawberry fruit are antagonistically regulated by both auxins and ABA (Medina-Puche *et al.*, 2016). To study the effect of ABA on the *FaMYB123* expression, two independent experiments were carried out to decrease the *FaNCED1* enzymatic activity. Injecting the inhibitor NDGA, and silencing *FaNCED1* expression. As expected, a clear decrease in both endogenous ABA content and *FaMYB123* expression was found in both experiments (Fig 6A, B). Water stress is well known to induce ABA accumulation. For this reason, *FaMYB123* gene expression and ABA content were

measured in fruits kept under water stress conditions. After eight days, a clear increase in *FaMYB123* expression was identified that correlated with a higher ABA content, and suggesting that *FaMYB123* transcription is regulated by ABA as other TFs related to changes in the organoleptic procedures that are related to the strawberry ripening process (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017; Medina-Puche *et al.*, 2015) (Fig 6C).

As shown in Fig 6D, when comparing *FaMYB123* expression in fruit receptacles five days upon removal of achenes in G3 fruits versus control, an increase in expression was observed. Moreover, this induction was abolished by external IAA application to deachened fruits, which indicates a negative regulation by auxins. All these results showed that, as with most genes related to the fruit quality properties, expression of the *FaMYB123* gene is regulated by both ABA and auxin levels in receptacle fruits.

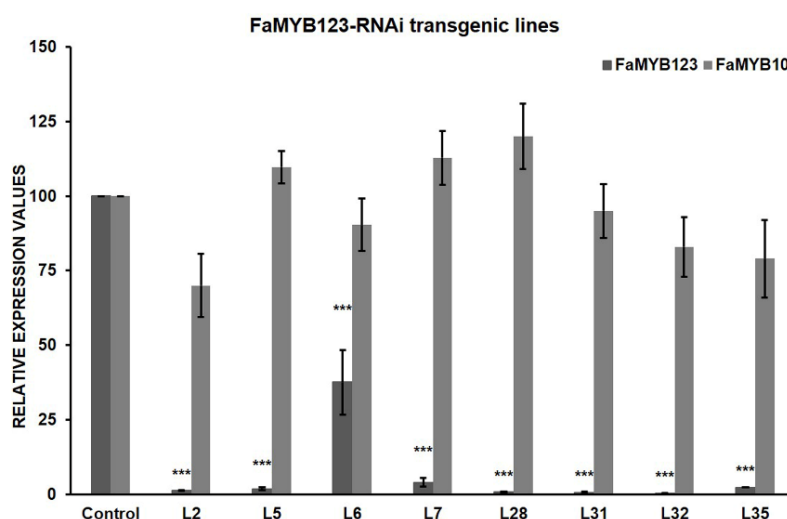


**Fig 6.** Analysis by qRT-PCR of *FaMYB123* and *FaNCED1* gene expression in (a). strawberry G-W fruits agroinfiltrated with the *NCED1*-RNAi construct, (b). G-W fruits treated with NDGA and (c). Strawberry G-W fruits under water stress. The dashed line indicates the ABA content in the analysed fruits. (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 H<sub>2</sub>O; NDGA: G-W fruits injected with NDGA (100 μM); both samples were harvested 8 days after the beginning of treatment. (c) Control fruit: fruits with their pedicels immersed in MS medium with sucrose. *FaMYB123* and *FaNCED1* gene expression were analysed in fruits, with their pedicels kept in the air. (d) Analysis by qRT-PCR of the effects of removing achenes from G3 developing fruits and their treatment with auxins on *FaMYB123* gene expression. After auxin treatment, the increase in mRNA value was relative to G3 fruit (control), which was assigned an arbitrary value equal to unity. Control G3: middle-sized green fruit receptacle; G3 -Ac +Lan: G3 fruit receptacle without achenes for 5 days and covered with lanolin; G3 -Ac

+IAA +Lan: G3 fruit receptacle without achenes plus IAA, diluted in lanolin, for 5 days (added at day zero). The cultivar used was *Fragaria × ananassa* cv. Elsanta. 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. Gray bars *FaNCED1*, black bars *FaMYB123*, lines ABA content.

### Expression analysis shows that *FaMYB123* is a regulator of the anthocyanin biosynthesis pathway

The potential regulatory role played by *FaMYB123* in the expression of genes involved in the strawberry fruit receptacle ripening-related process was assessed through transcriptomic studies. To this end, the expression of *FaMYB123* gene was permanently downregulated by RNAi in transgenic strawberry plant. For comparative analysis, control fruits proceeding of explants transformed with the empty pFRN vector were used. The degree of *FaMYB123* silencing was analysed in the transgenic receptacles (Fig 7). Lines 28, 31 and 32 were selected for further analysis, as they present the lowest expression, below 10%, when comparing to the control receptacles. *FaMYB10* expression was determined as an indicator of the ripening stage

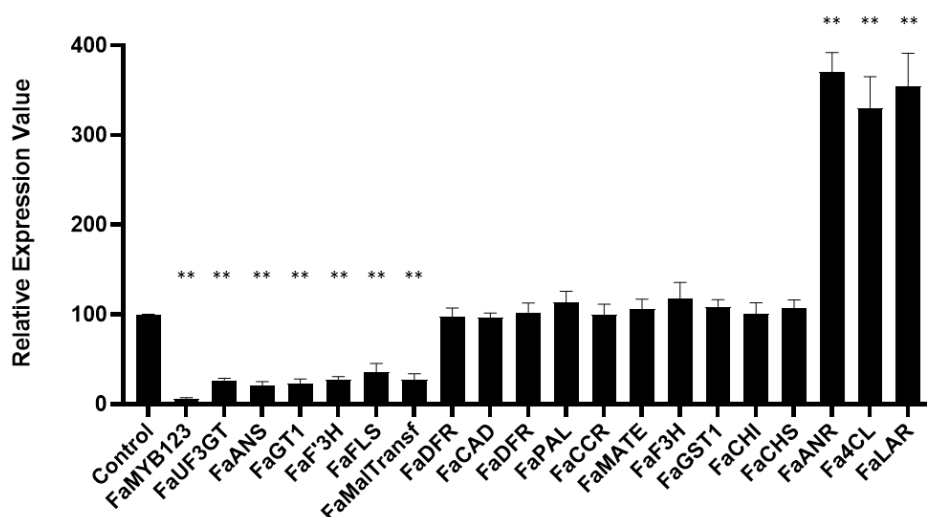


**Fig 7.** Analysis by qRT-PCR of *FaMYB123* and *FaMYB10* gene expression in transgenic *FaMYB123*-RNAi strawberry fruits (*F. × ananassa* cv. Elsanta) transformed with the empty pFRN vector (control) and pFRN-*FaMYB123* construct. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (\*\*\*) *p*-value < 0.001.

A clear reduction of genes involved in anthocyanin biosynthesis has been found. Among them, *anthocyanin synthase*, *FaANS1* (*gene32347*, *FvH4\_5g01170*) (Almeida *et al.*, 2007) and *anthocyanin glucosyl transferase*, *FaUFGT* (*gene12591*, *FvH4\_7g33840*), demonstrated to be responsible for the content of the major anthocyanin component, pelargonidin-3-glucose (Griesser *et al.*, 2008), were downregulated. Also, some malonyltransferases were downregulated, including the *FaMalTransf* (*gene04258*, *FvH4\_6g46740*), a putative *anthocyanin malonyl transferase* (Fig 8) (Davik *et al.*, 2020).

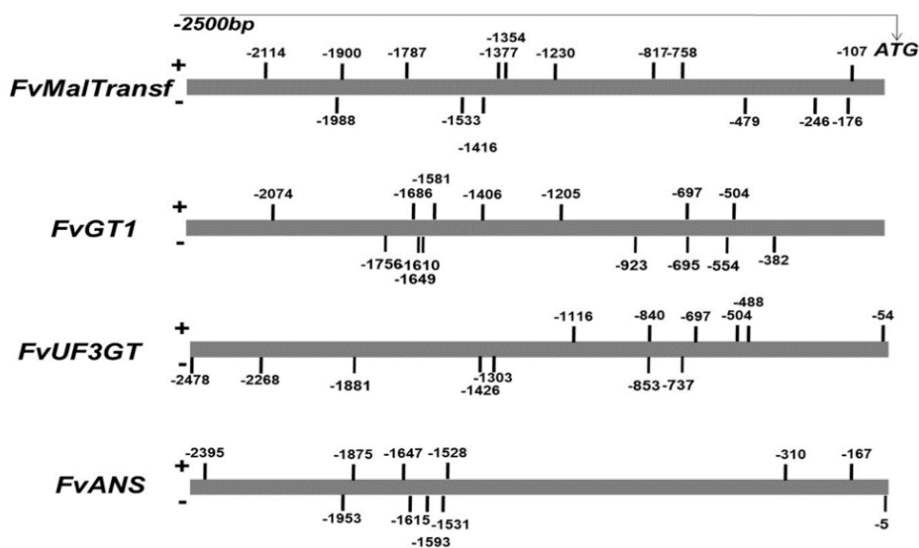


Furthermore, the *flavanone 3-hydroxylase*, *FaFLS* (*gene01064*, *FvH4\_2g29990*; (Almeida *et al.*, 2007)) responsible for the synthesis of kaempferol, and the *flavonoid 3'monoxygenase* *FaF'3H* (*gene05304*, *FvH4\_6g34950*), were downregulated. The *FaUF3GT* (*gene11466*, *FvH4\_4g03650*), which presents high homology with other kaempferol-3-glucosyltransferases previously described in *Rosa hybrida* (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2011), also appears to be downregulated. These data were corroborated by qRT-PCR analysis (Fig 8), indicating that FaMYB123 is a putative regulator of anthocyanin/flavonol derivatives.



**Fig 8.** Expression data of selected genes related with phenylpropanoid and flavonoid metabolism in FaMYB123-silenced receptacles obtained by qRT-PCR. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (\*\*) p-value < 0.01

*In-silico* analyses of the gene promoters putatively regulated by FaMYB123: *FvUFGT*, *FvMalTransf*, *FvANS* and *FvUF3GT* were obtained from the public databases. Several MYB-binding boxes were found in these promoters which may indicate that FaMYB123 would directly transactivate the expression of those genes (Fig 9).

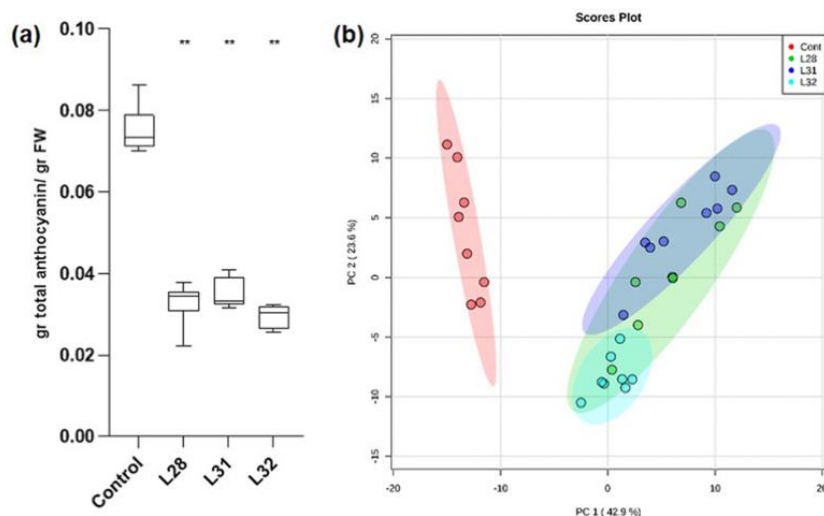


**Fig 9.** Schematic diagram of *FaMalTransf*, *FvGT1*, *FvUF3GT*, *FvANS* promoters from *Fragaria vesca*. The upper bar shows the length of the promoter fragment relative to the ATG start codon. The location of the MYB motif is shown using black lines.



### Metabolite analysis of FaMYB123-RNAi transgenic fruits

Global metabolomic analysis showed that the total anthocyanin level, in transgenic fruit receptacles was significantly decreased (Fig 10A). To determine which compounds belonging to the phenylpropanoid/flavonoid/anthocyanin metabolic pathway present differences between control and *FaMYB123* silenced receptacles, the major soluble phenolic compounds were identified by LC-MS in three independent transgenics lines as well as in control receptacles. A principal component analysis of the compounds identified by LC-MS analysis was performed, following a clear separation between the transgenics and control receptacles was observed (Fig 10B).

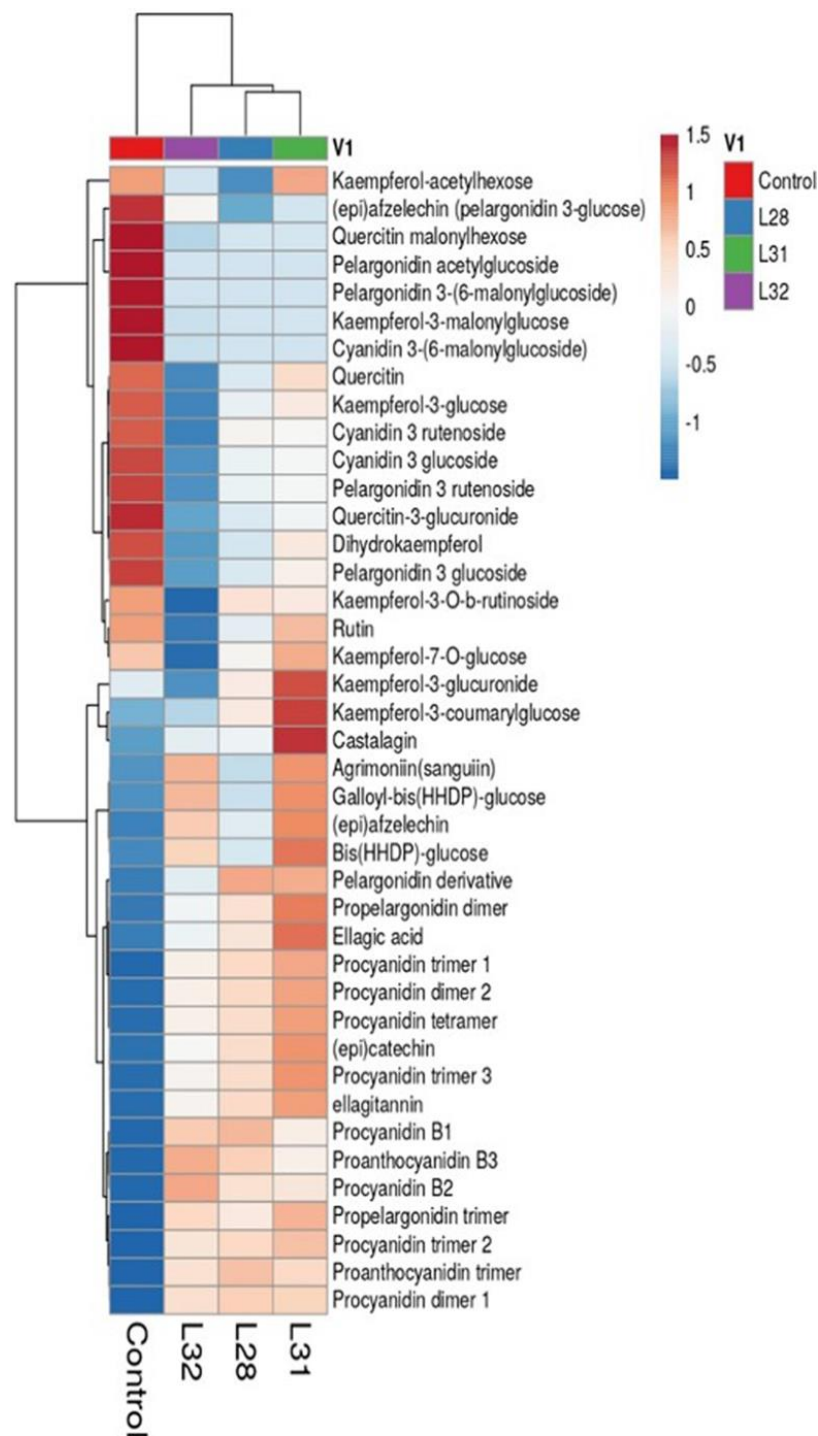


**Fig 10.** (a) Quantification of anthocyanin in control and FaMYB123-RNAi red receptacles; Values are obtained as absorbance measurement at 515nm. (b) Principal component analysis of metabolites identified in receptacles of control (red dots) vs transgenics lines (green, blue, and cyan dots). Eight replicates were used in metabolomic analysis for each condition

We observed in the transgenics receptacles changes in the metabolic contents. Higher levels of propealargonidins and procyanidins that are dimers and trimers of pelargonidin and cyanidin were found as well as higher contents of (epi)catechin and (epi)afzelechin (Fig 11, Additional file 1). These compounds are usually found in the unripe receptacles of strawberry, and normally they are catabolized to produce the anthocyanin monomers in the ripen receptacles. Also, epi(catechin), sanguin and ellagic acids are found in higher concentrations in transgenics receptacles, showing a general overaccumulation of condensed aggregates and tannins, which are usually present at minor levels in ripe receptacles

Moreover, the transgenic receptacles showed a clear decrease in pelargonidin-3-glucoside and an almost total loss of pelargonidin-3-(6'malonylglucoside), the major pelargonidin derivative, as shown in Fig 11, Additional file 1. Among other results, we observed a decrease in other derivates of pelargonidin, such as pelargonidin-3-rutenoside and pelargonidin-3,5-

diglucoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-(6'-malonylglucoside) and cyanidin-3-rutenoside (Fig 11, Additional file 1).



**Fig 10.** Heatmap representation of the secondary metabolism profiling by LC-MS analysis. Extracted anthocyanins, flavonols, procyanidin and proanthocyanidins and condensed tannins. The colour scale is shown on the right; red represents high content; blue represents low content.

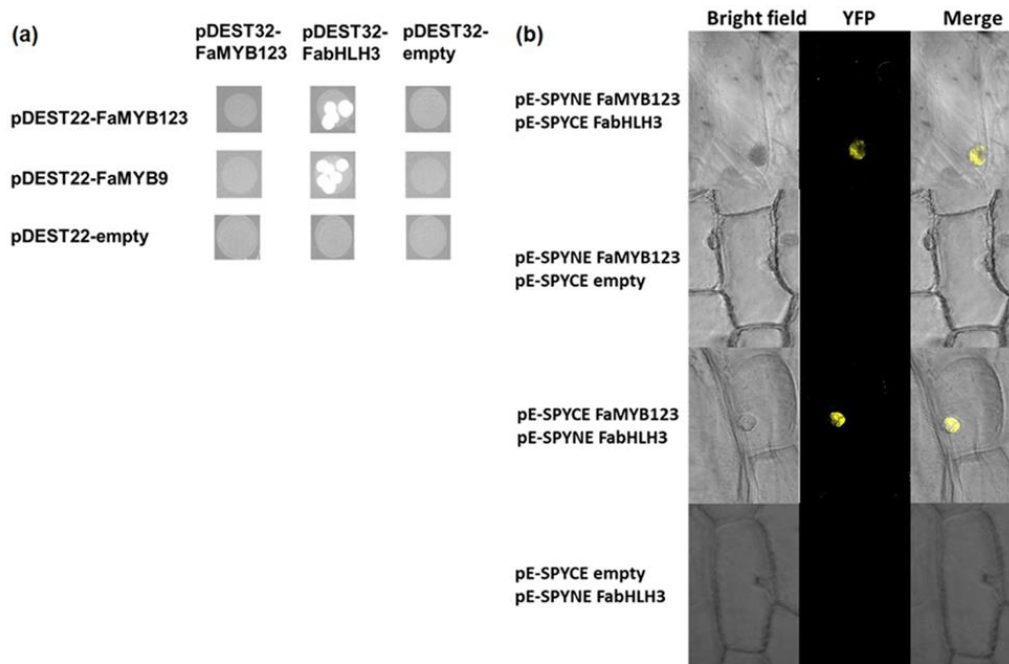
Levels of flavonols and flavones were also determined. The main component of flavonol in strawberry, kaempferol and its derivatives, as kaempferol-3-glucose, kaempferol-3-rutenoside, and kaempferol-3malonylglucose are less abundant in the transgenics than in the control

receptacles. Quercetins present the same pattern for quercitin-3-glucose and quercitin-3-malonylglucose, which are decreased in the transgenics fruits, as well as flavonoid quercitin-3-rutenoside (rutin), which also appears less represented (Fig 11, Additional file 1). Due to the silencing of *FaUF3GT*, the production of kaempferol-3-glucoside is down-regulated. This results in a redirection of the metabolic flux in the transgenics plant to the production of kaempferol-3-coumaryl-glucose, which is presented in higher concentration in the transgenics than in the control.

### **FaMYB123 interacts with FabHLH3, a flavonoid related TF**

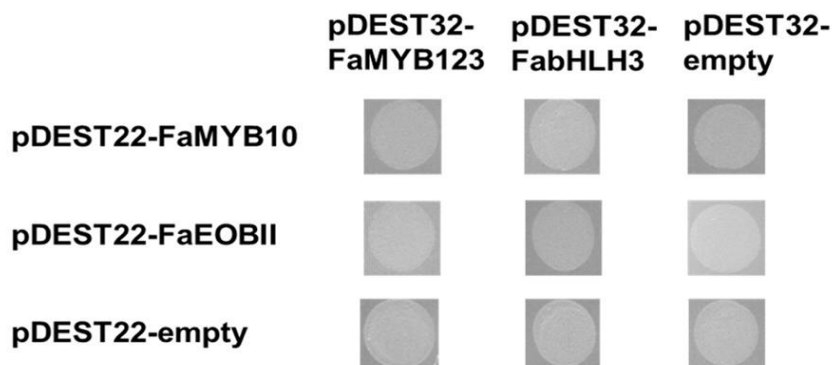
It has been previously described that the synthesis of proanthocyanins in immature strawberry receptacles is regulated by the interaction between FabHLH3 and FaMYB9 (an R2R3 TF MYB) (Schaart *et al.*, 2013). Interestingly, the expression of FabHLH3 gene is constitutive along fruit receptacle growth and ripening while the expression of FaMYB9 drastically decreased along the different stages of fruit development (Schaart *et al.*, 2013). This suggested the possibility that FabHLH3 also could interact with FaMYB123. To analyze the *in-vitro* binding capacity of FaMYB123 we performed a targeted Y2H experiment. The co-expression of FaMYB123 fused to the GAL4 DNA-binding domain and FabHLH3 to the GAL4 DNA-activating domain allowed yeast to grow on synthetic media lacking Leu, His and Trp and supplemented with 10mM of 3-AT, which was rated as a positive interaction (Fig 12A).

Similarly, we have observed growth between FabHLH3 and FaMYB9, which was used as a positive control (Schaart *et al.*, 2013). A BiFC assay was additionally performed to test the interaction between FaMYB123 and FabHLH3 *in vivo*. Both genes were co-transformed into an epidermal onion cell by microparticle bombardment. Using confocal microscopy, only YFP fluorescence was detected in the nucleus (Fig. 12B). No fluorescence was detected in negative controls. These results showed that both FaMYB123 and FabHLH3 can physically interact, both *in vitro* and *in vivo*.



**Fig 12.** (a) Yeast two hybrid assay for the interaction between FaMYB123 with FabHLH3. Open reading frames of the *FaMYB123*, *FabHLH3* and *FaMYB9* TFs were recombined into the bait vector (pDEST32) and prey vector (pDEST22). The yeast stains used for the drop test were PJ69-4a (MAT $\alpha$ ) and PG69-4 $\alpha$  (MAT $\alpha$ ). pDEST32-*FabHLH3* and pDEST22-*FaMYB9* were used as positive controls. The empty vectors pDEST22 or pDEST32 were also co-transformed as negative controls. The ability of yeast cells to grow on synthetic defined medium lacking Leu, Trp, and His but containing 10 mM of 3-AT was scored as a positive interaction. (b) BiFC. Yellow fluorescent protein (YFP) reconstruction in the nuclei of bombarded onion (*Allium cepa*) epidermal cells transformed with constructs containing *FaMYB123* and *FabHLH3* fused with halves of YFP. Merge indicates a digital merge of brightfield and fluorescent images.

To test if FabHLH3 was able to bind other MYB TF distinct than FaMYB123, we also tested the interaction with FaMYB10 and FaEOBII, MYB TF with a ripening related expression pattern. FabHLH3 did not interact with these TFs, revealing a specificity for FaMYB123 and FaMYB9 (Fig 13).



**Fig 13.** Yeast two hybrid assay for the interaction between FaMYB10, FaEOBII with FabHLH3. Open reading frames of the *FaMYB123*, *FabHLH3* and *FaMYB9* TFs were recombined into the bait vector (pDEST32) and prey vector (pDEST22). The yeast stains used for the drop test were PJ69-4a (MAT $\alpha$ ) and PG69-4 $\alpha$  (MAT $\alpha$ ). The empty vectors pDEST22 or pDEST32 were also co-transformed as negative controls. The ability of yeast cells to grow on synthetic defined medium lacking Leu, Trp, and His but containing 10 mM of 3-aminotriazole was scored as a positive interaction.

## Discussion

During the ripening process, many metabolic pathways are involved to produce the physiological changes responsible of organoleptic properties of strawberry, such as colour, aroma, and flavour. The molecular pathways that determine the quality properties of fruit receptacle are finely regulated by the action of various TFs (Aharoni *et al.*, 2001; Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015, Molina-Hidalgo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Vallarino *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). The results presented here bring out that the strawberry R2R3 MYB regulator, FaMYB123, interacting with the bHLH protein FabHLH3, are necessary for anthocyanin/flavonoid production along the ripen stages.

### **FaMYB123, a MYB-like TF is ripening-related and hormonally regulated.**

Bioinformatic analysis of the *FaMYB123* deduced protein indicate that it presents the typical R2R3 MYB domains as other MYB TFs. (Lipsick, 1996). (Fig 1A). The phylogenetic analysis with protein sequences of MYB TF with inferred function reveals that FaMYB123 show a high degree of similarity with *transparent testa* MYB TFs, as the *A.thaliana* AtTT2 and *V.vinifera* VvMYBPA2 (Fig 2). TT2 TF have been related with the regulation of structural genes related to proanthocyanidin production (Baudry *et al.*, 2004; Terrier *et al.*, 2009). However, recently there have been described that TT2 are also involved in the production of anthocyanin in fruits (Wang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

Most of the genes that encode enzymes related to organoleptic properties of the strawberry fruit receptacle present a common global gene expression model. This is characterized by being: (i) induced throughout the fruit receptacle ripening; (ii) fruit specific expression and (iii) expression activated by ABA and repressed by auxins (Cluster UP ABA+AUX-; (Medina-Puche *et al.*, 2016). These expression criteria are fulfilled by genes responsible for the development of fruit colour (*FaUFGT*, *FaANS*), flavonols (*FaFLS*, *FaF'3H*) and phenylpropanoids metabolism related genes (*FaCAD1*, *FaCCR*, *FaEGS2*), aroma (*FaSAAT*, *FaAAT2*, *FaQR*), cell wall disassembly (*FaPLB*, *FaExpansin2*, *FaPG1* and *FaPG2*, *FaRGlyase1*, *Faβ 1-4 endoglucanase*) (Almeida *et al.*, 2007; Medina-Puche *et al.*, 2016), and references included in this paper). In addition, TFs functionally characterized throughout the ripening process as *FaMYB10* (Medina-Puche *et al.*, 2014), *FaEOBII* (Medina-Puche *et al.*, 2015), *FaDOF2* (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017) as well as *FaSCR* (Pillet *et al.*, 2015) display identical expression profiles to that observed for *FaMYB123*, and all belong to (Cluster UP ABA+AUX-). Interestingly, these TFs regulate the expression of structural genes belonging to discrete nodes of the flavonoid biosynthetic pathway and are responsible for some fruit quality characteristics. The expression of *FaMYB123* is predominately found in the late steps of ripening (R, OR), while low

levels are found in the early stages of the development process (Fig 5A). Moreover, its expression is related mainly to the receptacle, not being expressed in the achenes of any stages (Fig 5C) and found only in low expression in the vegetative tissues (Fig 5B). Similar expression profiles to that observed for *FaMYB123* are observed for other TFs that regulate the expression of different genes belonging to the flavonoid node such and above mentioned. This co-regulation between these transcription factors, could suggest according to the “guilt by association” principle, that *FaMYB123* would regulate genes belonging to these discrete nodes of the flavonoid biosynthetic pathway (Pillet *et al.*, 2015).

### **FaMYB123 partially regulates anthocyanin and flavonol metabolic pathways.**

As FaMYB123 protein present high sequence homology with other R2R3 MYB TF related with the phenylpropanoids/flavonoids/anthocyanins and proanthocyanins biosynthesis we focused the metabolomic analysis on these compounds. Additionally, we have determined the expression of the genes that codify the enzymes related to those pathways.

The metabolomic results of *FaMYB123*-RNAi transgenic receptacles displayed a reduction in total anthocyanin content, as well as an increase of proanthocyanin content (Fig 10, 11, Additional file 1). In strawberry fruits, anthocyanins are synthesized during the ripening process, while proanthocyanin are related to the early stages of growing and development (Aaby *et al.*, 2007; Buendía *et al.*, 2010). In our analysis we have found a clear decrease in the concentration of the predominant anthocyanins in strawberry fruits as pelargonidin-3-glucose, cyanidin-3-glucose as well as their malonyl derivatives pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside) and cyanidin 3-(6"-malonylglucoside) (Fig 11). These results are in line with the down regulation of *FaANS* and *FaUGT* gene expression that was observed in *FaMYB123*-RNAi receptacles. Both are structural genes encoding the last enzymes of the anthocyanin metabolic pathway, catalysing the synthesis of pelargonidin and pelargonidin-3-glucoside respectively (Almeida *et al.*, 2007; Griesser *et al.*, 2008). Indeed, the knockdown of *FaUGT* by RNAi produced a clear reduction on the content of pelargonidin-3-glucose and its malonyl derivate, receptacles (Griesser *et al.*, 2008). Similar pattern in these metabolites were found in *FaMYB123*-RNAi receptacles.

Recently, in *Fragaria vesca*, quantitative trait locus studies comparing three different hybrid population of strawberry (‘Carisma x Senga Sengana’; ‘Marlate x Senga Sengana’ and ‘Saga x Senga Sengana’), revealed a QTL associated with the presence/absence of pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside) and located in chromosome 6. In this single major gene locus seven genes coding putative phenolic glucoside malonyl transferase (FvH4\_6g46740.t1; FvH4\_6g46741.t1; FvH4\_6g46742.t1; FvH4\_6g46743.t1; FvH4\_6g46750.t1; FvH4\_6g46770.t1; FvH4\_6g46780.t1) were observed (Davik *et al.*, 2020). The expression of

three of them was up-regulated in ripen *Fragaria vesca* fruits (Hawkins et al., 2017). The expression of gene04258 (FvH4\_6g46740, herein referred as FaMalTransf), was down-regulated in *FaMYB123*-RNAi receptacles, supporting that this gene is responsible for the biosynthesis of pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside) in strawberry ripen receptacle (Fig 8).

A clear reduction of flavonol pathway was also observed (Fig 15) concomitant with the reduction on *FaUF3GT* transcript level. This gene presents a high sequence homology with a flavonoid 3-glucosyltransferase from *Rosa hybrida* (RhUF3GT) responsible for the synthesis of kaempferol-3-glucoside (Fukuchi-Mizutani et al., 2011). Flavonol compounds as kaempferol-3-glucoside, kaempferol 3-(6"-malonylglucoside) as well as quercetin-3-glucoside and quercetin-3-(6"-malonylglucoside) were found in less concentration in transgenic receptacles. These results suggest that *FaMYB123* is controlling not only the late steps of the anthocyanin pathway but also other branch of the flavonoids metabolic pathway, related to the biosynthesis of flavonol compounds, as kaempferol and quercetin (Fig 15).

When *FaMYB123* is knocked down, we observed a higher expression of *FaANR*, encoding an anthocyanidin reductase, and *FaLAR*, encoding a leucoanthocyanidin reductase both enzymes related with the synthesis of epicatechin, epiafzelechin and other related compounds (Fig 8). Those up regulation in gene expression are in line with the increase of flavan-3-ols as catechin and epicatechin as well as their monohydroxylated equivalents afzelechin and epiafzelechin and glycosylated derivatives.

Interestingly, similar results were obtained in transgenic fruit receptacles in which the expression of *FaMYB10* was silenced, where a clear reduction in the quantity of pelargonidin-3-glucoside, pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside), cyanidin-3-glucoside, kaempferol-3-glucose, kaempferol-3-glucuronide, quercetin-3-glucuronide and (epi)afzelechin-catechin-dimers was found (Medina-Puche et al., 2014). Besides, an increase of the content of ellagic acid, cinnamoyl-glucose, caffeoyl-glucose, feruloyl-glucose and (epi)afzelechin-glucoside, was also observed (Medina-Puche et al., 2014). These changes in metabolites were accompanied by the down-regulation of receptacle specific and ripening related genes that are involved to the biosynthesis of these compounds as *FaPAL*, *FaCH4*, *FaCL*, *FaCHS*, *FaCHI*, *FaDFR*, *FaANS*, *FaUFGT* (Medina-Puche et al., 2014). Of these genes *FaCL*, *FaANS* and *FaUFGT* were also down regulated by *FaMYB123*, suggesting a synergistic effect between *FaMYB10* and *FaMYB123* in activating the promoters that they co-regulate (Fig 14). Similar results were found in receptacles where the silencing of the TF *FaSCL8* gene resulted in an increase of *FaANR1* gene expression (Pillet et al., 2015). This suggests that *FaMYB123*, as well as *FaSCL8*, could play additional regulatory roles, probably related to tannin and quercetin production in fruit receptacle.

### **FaMYB123 interacts with FabHLH3 in the nucleus**

A model on the regulation of the synthesis of proanthocyanins has been proposed in strawberry green immature fruits based on the interaction between FaMYB9 and FabHLH3 TFs, that might be able to activate the *FaANR* and *FaLAR* expression (Schaart *et al.*, 2013). This model was tested using a heterologous system where both TFs were co-expressed enabling the transactivation of the *AtANR* promoter (Schaart *et al.*, 2013). In transgenics *FaMYB123*-RNAi receptacles, contrary to what happens in red control fruits, the expression of *FaANR* and *FaLAR* was up-regulated. This suggests, that FaMYB123 through its with FabHLH3, would form a repressive complex of *FaLAR* and *FaANR* expression in normal ripe fruit receptacle. Additionally, we could not determine between FabHLH3 with other ripening related R2R3 MYB TFs as FaMYB10 and FaEOBII. We propose that FabHLH3, whose expression is constitutive throughout the developmental and ripening process, would play a pivotal role between the biosynthetic pathways of pro-anthocyanidins and that of flavonols and anthocyanins. This pivotal role would depend on the MYB TF interacting with bHLH3, thus, though the interaction with MYB9 will activate the proanthocyanin biosynthesis and with FaMYB123 the anthocyanin.

Even though TT2 TF have been related with proanthocyanin biosynthesis, it has been demonstrated that they can regulate the anthocyanin production in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) through a complex between a R2R3 MYB TF (AcMYB123) and a bHLH TF (AcbHLH42) (Wang *et al.*, 2019). AcMYB123 is most closely related to the Arabidopsis TT2/AtMYB132 and a putative orthologous of FaMYB123 and, as in the case of FaMYB123, activates the expression of structural genes belonging to late biosynthetic steps of the flavonoid pathway (LBG), as *AcANS* and *AcUGFT* (Wang *et al.*, 2019). In their work the authors conclude that both TFs are components involved in spatiotemporal regulation of anthocyanin biosynthesis in ripen kiwi fruit. Similar results were found in apple, where a TT2-like *MdMYBPA1* TF regulates synthesis of anthocyanin under low-temperature conditions by transactivating *MdANS* and *MdUGFT* promoters and therefore, their expression (Wang *et al.*, 2018). Furthermore, the *in silico* analysis of the promoters of *FvANS*, *FvUGFT*, *FvMalTransf* and *FvUF3GT* related to anthocyanin/flavonol pathway showed the presence of several MYB recognition boxes (Fig 9), suggesting that FaMYB123 would act on these promoters, being responsible of that regulation.

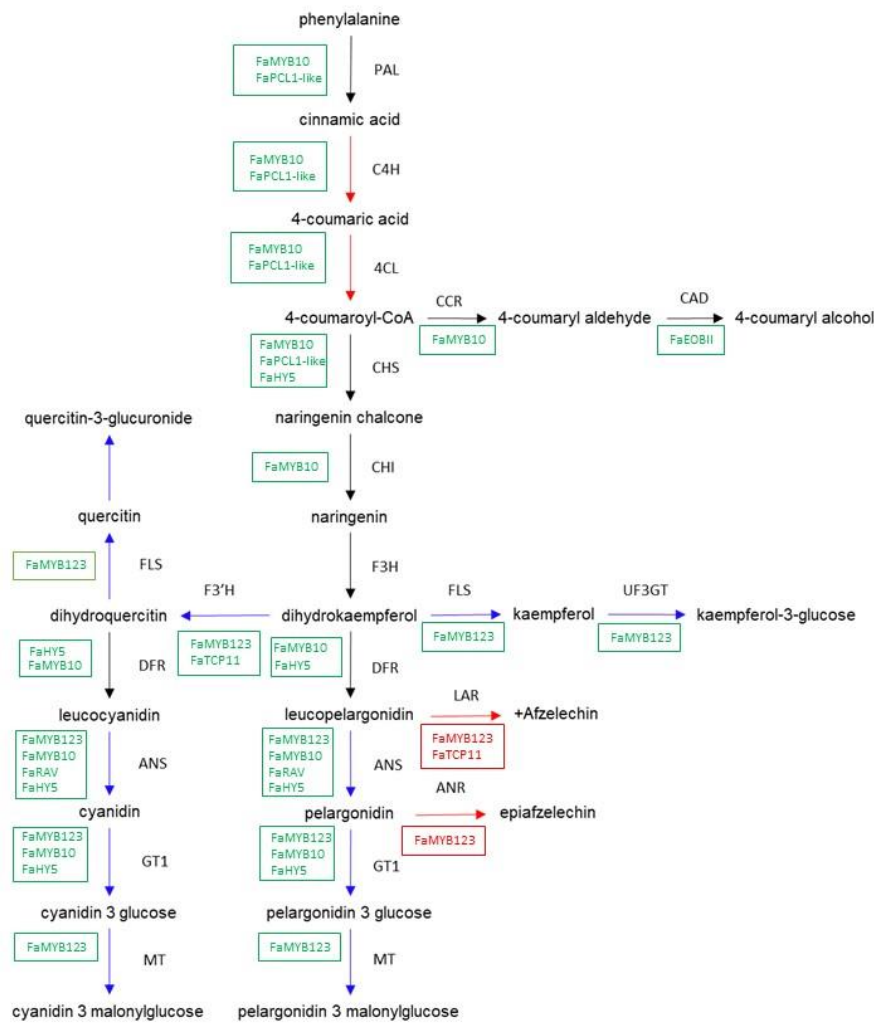
In eukaryotes, the regulatory activity of the gene promoters is influenced by their architecture. In an individual promoter, several different *cis*-regulatory sequences are contained. Depending on the synergistically binding of different TF, gene expression is regulated. In this sense, the expression of both early and late structural genes belonging to the phenylpropanoid pathway is regulated by a complex regulatory network of TF (Daminato *et al.*, 2013; Medina-



Puche *et al.*, 2014; Pillet *et al.*, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). In this network, FaMYB10 would play a central regulatory role in determining the correct expression of key genes belonging to the flavonoids biosynthetic pathway (Table 1, Fig 14).

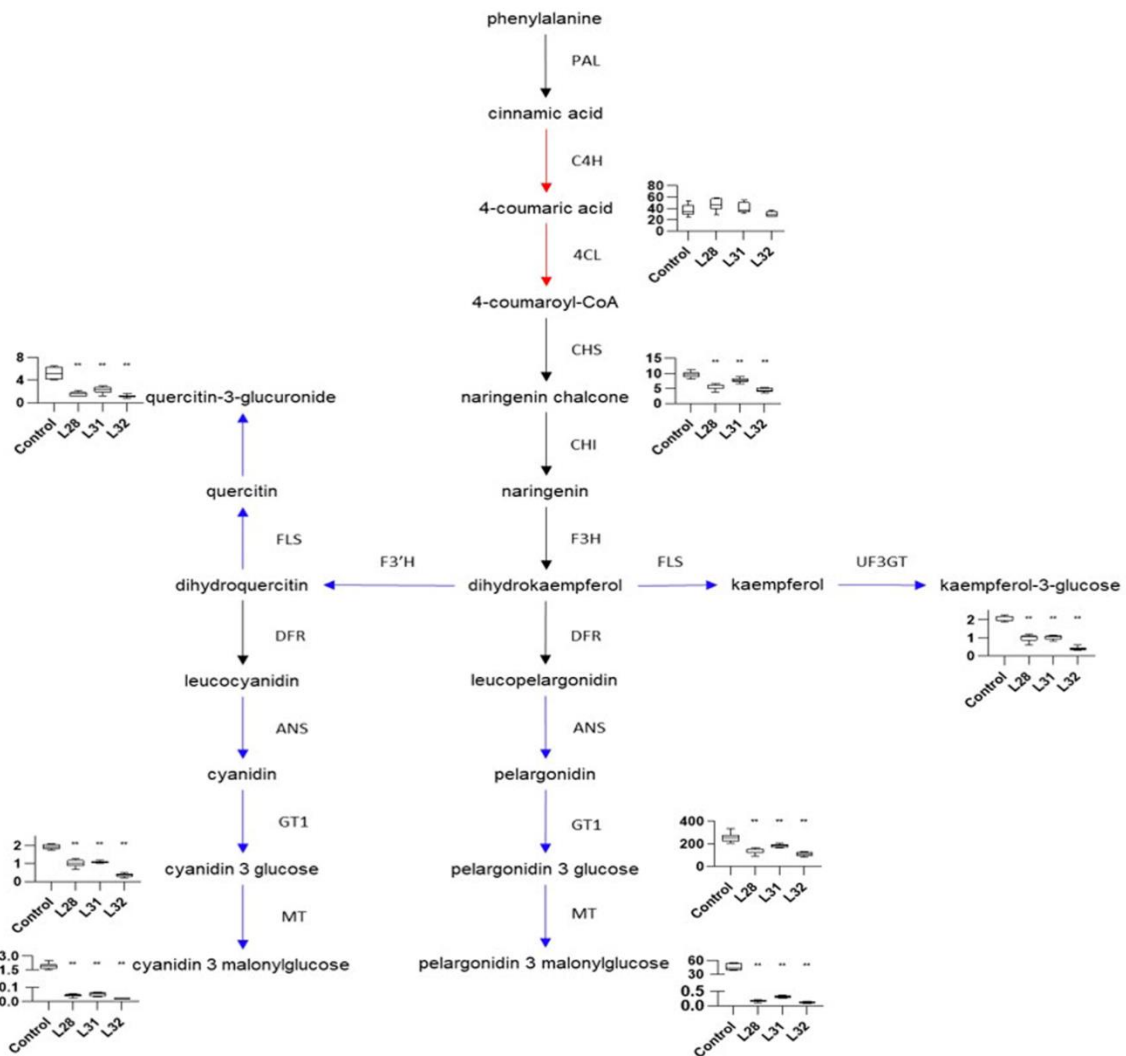
**Table 1.** Summary of ripening-related transcription factor previously described in strawberry involved in the regulation of flavonol/phenylpropanoid pathway and the enzymes that are putatively regulated by them.

Transcription factor	Down Regulated genes		Up-regulated genes		References
<i>FaSCL8</i> (RNAi)	PAL2 UFGT MYB10	CHS1/2 F3H CHI1	F3'H	ANR	Pillet et al., 2015
<i>FaPCL1-like</i> (RNAi)	PAL1/2 C4H	4CL CHS1/CHS2	FLS	LAR	
<i>FaTCP11</i> (OE)			LAR	F'3H	
<i>FaMYB10</i> (RNAi)	PAL C4H CCR 4CL CHS	CHI DFR UFGT F3H			Medina Puche et al., 2014
<i>FaRAV1</i> (OE)			CHS CHI F3H	DFR ANS UFGT	Zang et al., 2020
<i>FaRAV1</i> (RNAi)	CHS CHI F3H	DFR ANS UFGT			
<i>bHLH9-HY5</i> (dimer) (OE)			DFR UFGT	CHS ANS	Li et al., 2020
<i>bHLH9-HY5</i> (dimer) (RNAi)	DFR UFGT	CHS ANS			
<i>FaSHP</i> (RNAi)	MYB10	CHS PAL			Daminato et al., 2011
<i>FaSHP</i> (OE)			MYB10	CHS PAL	
<i>FaEOBII</i> (RNAi)	CAD	EGS2			Medina Puche et al.,
<i>FaMYB123</i> (RNAi)	ANS UFGT MalTransf	F'3H FLS Kaempferol-3- glucosyltranf erose	ANR	LAR 4CL	This article



**Fig 14.** Transcription factor regulating the flavonoid/anthocyanin/phenylpropanoid pathway based on previous analysis. Green boxes reveal a downregulation of the enzymes by these TF, while red boxes are an up-regulation

In turn, the expression of *FaMYB10* gene is regulated by other upstream TFs such as *FaSCR*, *FaRAV* and probably also by *FaSHF*. Additionally, *FaRAV1*, *FaHYS* and *FaMYB123* regulates, independently of *FaMYB10*, the expression of *FaANS*. Similarly, *FaMYB123* regulates the expression of *FaFLS*, *FaUF3GT*, *FaF3H* and *FaMaltransf* without the additional context of other functionally characterized TFs (Table 1, Fig 14). This specific regulation of gene expression was also observed for the case of *FaEOBII* other strawberry fruit specific and ripening related R2R3 MYB TF (Medina-Puche *et al.*, 2015). As in the case of *FaHYS*, *FaMYB123* expression was independent of that of the *FaMYB10* suggesting that *FaMYB123*, *FaHYS* and *FaMYB10* collaborate together, synergistically regulating the promoter activity of *FaDFR*, *FaUFGT* and *FaF3H* (Medina-Puche *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).



**Fig 15.** Schematic diagram of the phenylpropanoid, flavonoid, and anthocyanin pathway. Enzymes that are down- and upregulated due to *FaMYB123* knockdown are shown in blue and red, respectively. qRT-PCR data is included in FigS4. Boxplots show the levels of metabolites in control and transgenics receptacles. Y axis represent the normalized area of each compound in LC-MS analysis. PAL, phenylalanine lyase; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase; ANS, anthocyanidin synthase; C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; DFR dihydroflavonol reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; GT1, anthocyanin 3-glucosyltransferase; MT, malonyl transferase; UF3GT, UDP::flavonol 3 glucosyltransferase. (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

In summary, this work provides functional data demonstrating that *FaMYB123* is a ripening related, receptacle specific TF that, as in the case of *FaMYB10* and *FaEOBII*, regulates the late steps of the phenylpropanoid pathway in the strawberry fruit receptacles. *FaMYB123* is strongly regulated by both ABA and auxins, the key hormones that control the ripening process. The expression analysis combined with the metabolomic data in transgenics receptacles indicate that *FaMYB123* is regulating the branches the late steps of the phenylpropanoid pathway that produce pelargonidin-3-glucose, cyanidin-3-glucose as well as their malonyl derivatives pelargonidin 3-(6"-malonylglucoside) and cyanidin 3-(6"-malonylglucoside) the most abundant anthocyanins present in ripen strawberry receptacles and key components of the strawberry

colour, as well as flavonol compounds as kaempferol-3-glucoside, kaempferol 3-(6"-malonylglucoside) as well as quercetin-3-glucoside and quercetin-3-(6"-malonylglucoside).

## Material and methods

### Plant Material and RNA isolation

Strawberry plants (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Camarosa) were grown under field conditions in Huelva (S.W. Spain). Fruits at different developmental and ripening stages were harvested: small-sized green (G1, 2-3 g), full-sized green (G3, 5-8 g), white (W, 8-12 g), full-ripe red (R, 9-15 g) overripe (OR, 9-15 g) and senescent (SN, 9-15 g). Vegetative tissues, such as runners, roots, and expanding leaves, were also harvested. All analysed tissues were immediately frozen in liquid nitrogen upon harvesting and stored at -80 °C. *Nicotiana benthamiana* plants used for agroinfiltration were grown in a plant chamber at 25 °C, 10.000 lux and 80% humidity and afterwards maintained in a greenhouse. Total RNA was isolated, and further purified, from three independent pools of strawberry fruits at different developmental and ripening stages (at least 10 fruits per pool), as well as from vegetative tissues, as previously described in (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015).

### Hormone treatments

For auxin treatment, achenes of two sets of 50 full-sized green fruits (G3) were carefully removed from their receptacles with the use of a scalpel. One set of deached fruits was treated with indole-3-acetic acid (IAA) in lanolin paste (1 mL) containing 1 mM of auxin IAA in 1 % (w/v) DMSO. The control group was treated with the same paste, but without IAA. Auxin treatments, sample collection and analysis were performed according to (Medina-Puche *et al.*, 2014).

In ABA experiments, three approaches were used to modulate ABA content in fruits, two of them directly related to altering its biosynthetic pathway: either inhibiting NCED enzyme activity, by using nordihydroguaiaretic acid (NDGA), (Creelman *et al.*, 1992), or silencing the *FaNCED1* gene expression by RNAi. Fruits at early white stage of ripening were used. Treatment was performed in accordance with Medina-Puche *et al.*, (2014). On the other hand, water stress treatments were reported to increase ABA content in fruit (Medina-Puche *et al.*, 2014). For this purpose, fruits at white stage were harvested along with their pedicels; in the stress group, fruits were kept with their pedicel outdoors, whereas the control group were immersed in a MS medium with sucrose, which was changed every two days. The stress treatment condition and sample analysis were performed as described in Molina-Hidalgo *et al.*, (2015). These samples were used

for ABA measurement and relative expression of *FaMYB123* and *FaNCED1*. ABA extraction procedure and HPLC-MS conditions was performed as described in Medina-Puche et al., (2014).

### **Analysis of nucleotide and deduced amino acid sequence of FaMYB123 gene**

*In-silico* analysis of the *FaMYB123* gene sequence was made using the available resources both from the European Bioinformatics Institute server (EBI; <http://www.ebi.ac.uk>) and the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)). Prediction of functional sites and domains in the protein sequence was performed using the InterProScan 5.0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>). Subcellular location was predicted using CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). We used the BlastP algorithm to align the amino acid FaMYB123 sequence against databases. The GDR database using the best available *F. vesca* genome (v 4.01) (Edger *et al.*, 2019) was used to localize the promoters used for *in-silico* studies. Analysis of promoters were performed using the PlantCARE database (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). To align FaMYB123 with other R2R3 MYB TF, sequences from other species with inferred function were downloaded from the databases. Sequences from *A.thaliana* were downloaded from TAIR database. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree were performed with EBI Clustal W2 program. Representation were performed with FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>), using a bootstrap analysis with 1000 replicates.

### **Generation of FaMYB123-RNAi construct and silencing of FaMYB123 expression in strawberry plants**

The *FaMYB123* gene was cloned into pFRN-RNAi binary vector (courtesy of Marten Denekamp from Department of Molecular Cell Biology, University of Utrecht, The Netherlands) using the Gateway technology (Invitrogen). Briefly, a region from the *FaMYB123* cDNA was PCR-amplified and used in the silencing construct (primers listed in Table S3). 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-*FaMYB123*) was tested by sequencing prior to strawberry plant transformation. The protocol used to generate the *FaNCED1*-RNAi constructs was similar, as described in Medina-Puche et al., (2014).

The generated pFRN-*FaMYB123* plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 strain. Then, leaf discs of strawberry plants, cv. Chandler, micropropagated *in vitro* were used as explants for *Agrobacterium*-mediated transformation experiments, following the protocol described in (Barceló *et al.*, 1998). Explants were inoculated with a diluted culture of *A. tumefaciens* and selected in 25mg L<sup>-1</sup> kanamycin. After 7–8 months of selection, kanamycin-

resistant shoots were acclimated and transferred to the greenhouse. Transgenic mother plants were propagated by runners and the daughter plants were used for phenotypic analysis. The presence of the transgenes in these putative transgenic lines was confirmed by PCR amplification of a fragment belonging to the *nptII* gene.

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo *et al.*, 1991), containing the *pFRN-FaNCED1* was used to inject 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 independently inoculated and analysed. As control, fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector were used. In all cases, the silencing percentage was determined by comparing the amount of *FaMYB123* or *FaNCED1* transcripts in pFRN-*FaMYB123* and pFRN-*FaNCED1* fruits, respectively, against those observed in empty pFRN vector transgenic fruits.

### **Expression analysis by quantitative real-time PCR**

Expression analyses of *FaMYB123* and the genes herein analysed and studied throughout all physiological conditions, were performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using an 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), according to manufacturer's instructions. Table 3 depicts the primer sequences used for quantitative amplification. 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. This gene was selected as control owing to its constitutive expression throughout all the different tested experimental conditions (Amil-Ruiz *et al.*, 2013). All these values were later used to determine the relative increase or decrease of expression of those genes studied as compared against their expression in control, in accordance with Pedersen and Amtssygehus, 2001.

**Table 3.** Primer sequences used in this work. Fw: forward; Rv: reverse. Up: upper; Low: lower.

Gene	Purpose	Primer	Sequence 5'-3'
<i>FaMYB123</i>	GFP construct	attB-MYB123-fw attB-MYB123-rv	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAACAATGAATA CAGGAGCTTGGACT GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAAGCTGGGTCTCAACAGCAAAATGGGAGCTC
	qRT-PCR	MYB123qRTFw MYB123qRTRv	AGGCAACAGGTCTACCACTGCCTTC TTCTTGCCGGATTCTGATGGACTGC
	RNAi construct	FaMYB123RNAiGWFw FaMYB123RNAiGWRv	CACGGCGAAGGAAAGTGGAGCA ACCGAACAAACAACCTTCTGTTGGG
<i>FaNCED1</i>	qRT-PCR	FaNCED1up FaNCED1low	GAGCTTGAAAGATGTGTGTTCGGAAA CGGTTACGCAATGGCCAGATAAGCATA
<i>Interspacer 26S-18S</i>	qRT-PCR	413fw 413rv	ACCGTTGATTCGCACAATGGTCATCG TACTCGGGTCCGCAATCCGACG
<i>gene09753 (FaPAL)</i>	qRT-PCR	09753qRT-UP 09753qRT-LOW	GGCGAAAAGGTCACGGTCAC CTGGCACAATAGCTGTGAATACC
<i>gene28093 (FaC4H)</i>	qRT-PCR	28093qRT-UP 28093qRT-LOW	ACCGTGTACCGTGAAGCACT GGTGAAGAAAGGAACCGTCA
<i>gene09603 (Fa4CL)</i>	qRT-PCR	09603qRT-UP 09603qRT-LOW	TGATATTGACAAAGGCGTTGAA CGACGAACAACCTGAGTGACC
<i>gene21346 (FaCHI)</i>	qRT-PCR	21346qRT-UP 21346qRT-LOW	GGTGCATGGGTTGAGAAAGT TAAATGGCTTGGAGGTTGTGA
<i>gene12591 (FaGT1)</i>	qRT-PCR	12591qRT-UP 12591qRT-LOW	CACCGATCTTGAAGGACGGAC AGCAGCTTATCAGCCACA
<i>gene24655 (FaANR)</i>	qRT-PCR	24655qRT-UP 24655qRT-LOW	AAGGGAGCTTTGATGCTGCT CTCCTTGGACTCCTGGCTTG
<i>gene32347 (FaANS)</i>	qRT-PCR	32347qRT-UP 32347qRT-LOW	AGCGCTGTTTAAATATGGGTGC ACCAACGGAAAACACCCGAA
<i>gene31413 (FaMYB10)</i>	qRT-PCR	31413qRT-UP 31413qRT-LOW	CGGCTTCAACGCAAAAGCAA GAGICTGTGGTGGTGTGTT
<i>gene14611 (FaF3H)</i>	qRT-PCR	14611qRT-UP 14611qRT-LOW	GCGTTTCCAGATTGTGAT TAAAATGGCTGGAAACGATGA
<i>gene26825 (FaCHS)</i>	qRT-PCR	26825qRT-UP 26825qRT-LOW	TGCTTCACAAAATCAAAATGG AGATTTGTCACTGTGGTGAT
<i>gene14712 (FaDFR2)</i>	qRT-PCR	14712qRT-UP 14712qRT-LOW	AAATCCCGGACCAATTAAC CTGATTTCTGATCGTGGAGT
<i>gene01064 (FaFLS)</i>	qRT-PCR	18732qRT-UP 18732qRT-LOW	TCACACTGACAAAACAATGGA TTCTCCACACATCATGACTC
<i>gene05304 (FaF3H)</i>	qRT-PCR	05304qRT-UP 05304qRT-LOW	ACACTAACGCTTTGCTCAAA CCCCAATATTCAACACTCCA
<i>gene29482 (FaDFR)</i>	qRT-PCR	29482qRT-UP 29482qRT-LOW	GAGCATCTGGGTTCAATGC TCCACTATTACATCAAGGAGC
<i>gene04258 (FaMalTransf)</i>	qRT-PCR	04258qRT-UP 04258qRT-LOW	CTTCGACTTCGTCAGGTT ACTTACAGCTACAACCACTC
<i>gene11466 (FaUF3GT)</i>	qRT-PCR	11466qRT-UP 11466qRT-LOW	TATCTCACTCTCTCCGGTT GGTAGGAAACAACCTTATT
<i>gene15073 (FaMATE)</i>	qRT-PCR	15073RT-UP 15073RT-LOW	TGCAATCAGTGTGAGGGTGT ATTTCCGATCTTGGCAATTC
<i>gene18167 (FaGST1)</i>	qRT-PCR	18167qRT-UP 18167qRT-LOW	TTTGACGATGGCCATTT AATGGGATATATGCAATGTCAAGC
<i>gene20700 (FaCAD1)</i>	qRT-PCR	20700qRT-UP 20700qRT-LOW	CGACTTGATCTCCGAGTT TGAGTTGATGACCACAAATGTT
<i>gene29483 (FaCCR)</i>	qRT-PCR	29483qRT-UP 29483qRT-LOW	GTGCTGGAAAAGGCACTGG TTGGCAACAACAACCTCTGC
<i>gene19221 (FaLAR)</i>	qRT-PCR	19221qRT-UP 19221qRT-LOW	ATAGGCAAAATGGCTGGGGT GGGTACCCATTTCTTGCAC

### Total anthocyanin analysis

Approximately 100mg of fresh weight of control and transgenics receptacles was poured into 1mL of 1% (v/v) hydrochloric acid/methanol and kept at 4°C in continuous movement for 10 min. The slurry was centrifugated at 1500g at 4°C for 10 min. The supernatant was saved and the absorbance at 515nm was determined. The amount of anthocyanin was calculated by using  $E_{\text{molar}} = 36000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Woodward, 1972; Bustamante *et al.*, 2009). Six replicates were performed per each analysis.

### Metabolite extraction, HPLC analysis and identification

For LC-MS analysis, approximately 100mg were lyophilized (Christ RVC 2-18) for 24hr, a total of 8 biological replicates were used. The lyophilized powder was extracted with 800µl of 100% methanol with 0.2µg/mL of isovitexin as internal standard and incubated for 15 min at 70°C. Then 400µL of water were added and centrifuged at 12.000g for 10 minutes. An aliquot of 400µL was collected and dried under vacuum. After completely dryness, it was suspended in 50% (v/v) methanol:water.

Secondary metabolites were profiled by the Waters Acquity UPLC system coupled to the Q-Exactive Orbitrap mass detector according to the previously published protocol (Giavalisco *et al.*, 2009). The UPLC system was equipped with an HSS T3 C18 reversed phase column (100 × 2.1mm i.d., 1.8- $\mu$ m particle size; Waters) that was operated at a temperature of 40°C. The mobile phases consisted of 0.1% formic acid in water (Solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (Solvent B). The flow rate of the mobile phase was 400  $\mu$ L/min, and 2 $\mu$ L of sample was loaded per injection. The UPLC was connected to an Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) via a heated electrospray source (Thermo Fisher Scientific). The spectra were recorded using full scan mode of negative and positive ion detection, covering a mass range from m/z 100 to 1500. The resolution was set to 25,000, and the maximum scan time was set to 250ms. The sheath gas was set to a value of 60, while the auxiliary gas was set to 35. The transfer capillary temperature was set to 150°C, while the heater temperature was adjusted to 300°C. The spray voltage was fixed at 3kV, with a capillary voltage and a skimmer voltage of 25 and 15V, respectively. MS spectra were recorded from minute 0 to 19 of the UPLC gradient. Molecular masses, retention time, and associated peak intensities were extracted from the raw files using RefinerMS (version 5.3; GeneData), and Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Metabolite identification and annotation were performed using standard compounds, and extracted from Del Bubba *et al.*, 2012; D'Urso *et al.*, 2016; Enomoto *et al.*, 2018; Vallarino *et al.*, 2020. Data are reported in a manner compliant with the standards suggested by Fernie *et al.*, (2011). A complete report of metabolites identified are shown in Additional file 1.

### **Cloning the full-length sequence of FaMYB123 and subcellular location of the protein coded**

The construct used for transient gene expression and localization studies was derived from binary vector pK7WGF2.0, which allow N-GFP fusion to FaMYB123 protein (Karimi *et al.*, 2002). The full length CDS of the strawberry *FaMYB123* gene was amplified and cloned into entry vector pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen) using the BP recombination reaction (Invitrogen). Full-length cDNA was subsequently transferred to the pK7WGF2.0 vector, using the LR recombination reaction (Invitrogen), resulting in 35S-GFP-*FaMYB123* fusion. Generated GFP construct was tested through sequencing prior to *Nicotiana* leaves transformation. The methodology used for agroinfiltration visualization and subcellular localization of the protein has been previously described (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015).

### **Yeast-two-hybrid interaction studies**

To perform the yeast-two-hybrid (Y2H) studies, the ORF sequence of *FaMYB123* was recombined into the pBDGAL4 bait vector (pDEST32; Invitrogen) and pADGAL4 prey vector (pDEST22; Invitrogen) by means of an LR reaction. The resulting vectors were transformed into



yeast strains PJ69-4 $\alpha$  (MAT $\alpha$ ) and PJ69-4a (MATa) (James *et al.*, 1996) and used in Y2H studies as described in de Folter *et al.*, 2005. Briefly, yeast transformant were grown in appropriate selection liquid media lacking amino acids for selection (-Leu or -Trp) for 6hr and cell density adjusted to OD<sub>600</sub>=0.6. Then, a 5 $\mu$ L of the liquid culture of every interaction tested was plated out on a yeast media lacking His, Leu and Trp and supplemented with 10mM of 3-aminotriazole (3-AT) to test protein-protein interaction. Plates were incubated at 28°C for 3d. As positive control, pDEST32-FabHLH3 and pDEST22-FaMYB9 were used (courtesy of Dr. Jan Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). GenBank accession numbers for the genes are: FaMYB9, JQ989281; FabHLH3 JQ989284.

### **Bimolecular fluorescence complementation assay**

FaMYB123 and FabHLH3 were translationally fused to the N- and C-terminal domains of Yellow Fluorescent Protein (YFP) by LR Gateway recombination reaction between the entry vector pDONR221, harboring the FaMYB123 and FabHLH3 ORFs, and the destination vectors pE-SPYCE-GW and pE-SPYNE-GW (courtesy of Drs. Caroline Mayer and Wolfgang Dröge-Laser; Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg). Freshly prepared onion epidermal peels were co-bombarded with 1 $\mu$ m gold particles, coated with the proper DNA constructs, using a biolistic Helium gun device (DuPont PDS-1000; BioRad, USA). The fluorescence emission was measured after 48 h of incubation at 22°C in the dark in an Axio Observer.Z1 motorized inverted microscope.

### **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

### **Data statement**

Genbank accession number is MW081987 for FaMYB123 sequence

## References

- Aaby, K., Ekeberg, D. and Skrede, G.** (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4395–4406.
- Aharoni, A., Vos, C.H. De, Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N. and O’Connell, A.P.** (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.*, **28**, 319–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722774>.
- Almeida, J.R., D’Amico, E., Preuss, A., et al.** (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**, 61–71. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986107002317>.
- Amil-Ruiz, F., Garrido-Gala, J., Blanco-Portales, R., Folta, K.M., Muñoz-Blanco, J. and Caballero, J.L.** (2013) Identification and Validation of Reference Genes for Transcript Normalization in Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Defense Responses. *PLoS One*, **8**.
- Appelhagen, I., Lu, G.-H., Huep, G., Schmelzer, E., Weisshaar, B. and Sagasser, M.** (2011) TRANSPARENT TESTA1 interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant J.*, **67**, 406–419. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2011.04603.x>.
- Babraham Informatics** (2018) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Barbera, G. La, Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Zenezini Chiozzi, R. and Laganà, A.** (2017) Comprehensive polyphenol profiling of a strawberry extract (*Fragaria x ananassa*) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 2127–2142.
- Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J.A., Quesada, M.A. and Pliego-Alfaro, F.** (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, **54**, 29–36. Available at: <http://www.banglajol.info/index.php/PTCB/article/view/6888>.
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L.** (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **39**, 366–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255866>.
- Bemer, M., Dijk, A.D.J. van, Immink, R.G.H. and Angenent, G.C.** (2017) Cross-Family Transcription Factor Interactions: An Additional Layer of Gene Regulation. *Trends Plant Sci.*, **22**, 66–80. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.007>.
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L. and Muñoz-Blanco, J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.*, **54**, 633–645.
- Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P. and Pachter, L.** (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.*, **34**, 525–527. Available at: <http://www.nature.com/articles/nbt.3519>.
- Brendolise, C., Espley, R. V, Lin-Wang, K., et al.** (2017) Multiple copies of a simple MYB-binding site confers trans-regulation by specific flavonoid-related R2R3 MYBs in diverse species. *Front. Plant Sci.*, **8**,

1–15.

**Bubba, M. Del, Checchini, L., Chiuminatto, U., Doumett, S., Fibbi, D. and Giordani, E.** (2012) Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of *Fragaria vesca* L. berries and their comparative evaluation. *J. Mass Spectrom.*, **47**, 1207–1220.

**Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M. and Tomás-Barberán, F.A.** (2010) HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 3916–3926.

**Bustamante, C.A., Civello, P.M. and Martínez, G.A.** (2009) Cloning of the promoter region of  $\beta$ -xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Sci.*, **177**, 49–56. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945209000983>.

**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.

**Creelman, R.A., Bell, E. and Mullet, J.E.** (1992) Involvement of a Lipxygenase-Like Enzyme in Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **99**, 1258–1260. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.99.3.1258>.

**D’Urso, G., Maldini, M., Pintore, G., d’Aquino, L., Montoro, P. and Pizza, C.** (2016) Characterisation of *Fragaria vesca* fruit from Italy following a metabolomics approach through integrated mass spectrometry techniques. *LWT - Food Sci. Technol.*, **74**, 387–395. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.061>.

**Daminato, M., Guzzo, F. and 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**, 3775–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888065>.

**Davik, J., Aaby, K., Buti, M., Alsheikh, M., Šurbanovski, N., Martens, S., Røen, D. and Sargent, D.J.** (2020) Major-effect candidate genes identified in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) for ellagic acid deoxyhexoside and pelargonidin-3-O-malonylglucoside biosynthesis, key polyphenolic compounds. *Hortic. Res.*, **7**.

**Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G. and Delseny, M.** (1999) The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.*, **19**, 387–398. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1999.00529.x>.

**Edger, P.P., Poorten, T.J., VanBuren, R., et al.** (2019) Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.*, **51**, 541–547. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30804557>.

**Enomoto, H., Sato, K., Miyamoto, K., Ohtsuka, A. and Yamane, H.** (2018) Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 4958–4965.

**Fernie, A.R., Aharoni, A., Willmitzer, L., et al.** (2011) Recommendations for Reporting Metabolite Data. *Plant Cell*, **23**, 2477–2482. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.111.086272>.

**Folter, S. de, Immink, R.G.H., Kieffer, M., et al.** (2005) Comprehensive Interaction Map of the

Arabidopsis MADS Box Transcription Factors. *Plant Cell*, **17**, 1424–1433. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.105.031831>.

**Fukuchi-Mizutani, M., Akagi, M., Ishiguro, K., Katsumoto, Y., Fukui, Y., Togami, J., Nakamura, N. and Tanaka, Y.** (2011) Biochemical and molecular characterization of anthocyanidin/flavonol 3-glucosylation pathways in *Rosa X hybrida*. *Plant Biotechnol.*, **28**, 239–244.

**Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J.M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B. and Battino, M.** (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct.*, **6**, 1386–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25803191>.

**Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B. and Battino, M.** (2012) The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, **28**, 9–19. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900711003066>.

**Giavalisco, P., Köhl, K., Hummel, J., Seiwert, B. and Willmitzer, L.** (2009) 13 C Isotope-Labeled Metabolomes Allowing for Improved Compound Annotation and Relative Quantification in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Metabolomic Research. *Anal. Chem.*, **81**, 6546–6551. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac900979e>.

**Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M.L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Munoz-Blanco, J. and Schwab, W.** (2008) Redirection of Flavonoid Biosynthesis through the Down-Regulation of an Anthocyanidin Glucosyltransferase in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiol.*, **146**, 1528–1539. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.114280>.

**Hoffmann, T., Kalinowski, G. and 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**, 818–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092319>.

**James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978031>.

**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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.111.177311>.

**Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992820>.

**Kranz, H., Scholz, K. and Weisshaar, B.** (2000) c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J.*, **21**, 231–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10743663>.

**Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., et al.** (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 263–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839469>.

**Lai, Z., Schluttenhofer, C.M., Bhide, K., Shreve, J., Thimmapuram, J., Lee, S.Y., Yun, D.-J. and Mengiste, T.** (2014) MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. *Nat. Commun.*, **5**, 3064. Available at: <http://www.nature.com/articles/ncomms4064>.

**Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A.** (1991) A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis*

- Genomic Library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology*, **9**, 963–967. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1091-963>.
- Li, Y., Xu, P., Chen, G., Wu, J., Liu, Z. and Lian, H.** (2020) FvbHLH9 Functions as a Positive Regulator of Anthocyanin Biosynthesis by Forming a HY5–bHLH9 Transcription Complex in Strawberry Fruits. *Plant Cell Physiol.*, **61**, 826–837. Available at: <https://academic.oup.com/pcp/article/61/4/826/5722211>.
- Lin-Wang, K., McGhie, T.K., Wang, M., Liu, Y., Warren, B., Storey, R., Espley, R. V and Allan, A.C.** (2014) Engineering the anthocyanin regulatory complex of strawberry (*Fragaria vesca*). *Front. Plant Sci.*, **5**, 1–14.
- Lipsick, J.S.** (1996) One billion years of Myb. *Oncogene*, **13**, 223–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710361>.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**, 550. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281>.
- Ma, D. and Constabel, C.P.** (2019) MYB Repressors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. *Trends Plant Sci.*, **24**, 275–289. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138518302905>.
- Matías-Hernández, L., Jiang, W., Yang, K., Tang, K., Brodelius, P.E. and Pelaz, S.** (2017) AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **90**, 520–534. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tj.13509>.
- Medina-Puche, L., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Cumplido-Laso, G., García-Caparrós, N., Moyano-Cañete, E., Caballero-Repullo, J.L., Muñoz-Blanco, J. and Rodríguez-Franco, A.** (2016) Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Funct. Integr. Genomics*, **16**, 671–692. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-016-0510-3>.
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., et al.** (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, F.J., Boersma, M., et al.** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiol.*, **168**, 598–614. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931522>.
- Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Cañete-Gómez, C., et al.** (2017) The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J. Exp. Bot.*, **68**, 4529–4543. Available at: <http://academic.oup.com/jxb/article/68/16/4529/4067750/The-fruitspecific-transcription-factor-FaDOF2>.
- Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Gelis, S., et al.** (2015) Functional characterization of FaNIP1;1 gene, a ripening-related and receptacle-specific aquaporin in strawberry fruit. *Plant Sci.*, **238**, 198–211.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L.** (2000) The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in *Arabidopsis* Siliques. *Plant Cell*, **12**, 1863–1878. Available at: doi: 10.1105/tpc.12.10.1863.
- Pedersen, S. and Amtssygehus, A.** (2001) Multiplex Relative Gene Expression Analysis by Real-Time

RT-PCR Using the iCycler iQ Detection System. *BioRadiations*, **107**, 10–11. Available at: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_2696.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2696.pdf).

**Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In *Horticultural Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 267–297. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650585.ch8>.

**Pillet, J., Yu, H.-W., Chambers, A.H., Whitaker, V.M. and Folta, K.M.** (2015) Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *J. Exp. Bot.*, **66**, 4455–4467. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979996>.

**Pireyre, M. and Burow, M.** (2015) Regulation of MYB and bHLH Transcription Factors: A Glance at the Protein Level. *Mol. Plant*, **8**, 378–388. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205214000483>.

**Qiao, Q., Xue, L., Wang, Q., Sun, H., Zhong, Y., Huang, J., Lei, J. and Zhang, T.** (2016) Comparative transcriptomics of strawberries (*Fragaria* spp.) provides insights into evolutionary patterns. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1–10.

**Schaart, J.G., Dubos, C., Romero, I., et al.** (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol.*, **197**, 454–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157553>.

**Soneson, C., Love, M.I. and Robinson, M.D.** (2016) Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, **4**, 1521. Available at: <https://f1000research.com/articles/4-1521/v2>.

**Terrier, N., Torregrosa, L., Ageorges, A., Vialet, S., Verriès, C., Cheynier, V. and Romieu, C.** (2009) Ectopic Expression of VvMybPA2 Promotes Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine and Suggests Additional Targets in the Pathway. *Plant Physiol.*, **149**, 1028–1041. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.108.131862>.

**Vallarino, J.G., Merchante, C., Sánchez-Sevilla, J.F., et al.** (2020) Characterizing the involvement of FaMADS9 in the regulation of strawberry fruit receptacle development. *Plant Biotechnol. J.*, **18**, 929–943. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbi.13257>.

**Wang, L., Tang, W., Hu, Y., et al.** (2019) A MYB/bHLH complex regulates tissue-specific anthocyanin biosynthesis in the inner pericarp of red-centered kiwifruit *Actinidia chinensis* cv. Hongyang. *Plant J.*, **tpj.14330**. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.14330>.

**Wang, N., Qu, C., Jiang, S., et al.** (2018) The proanthocyanidin-specific transcription factor MdMYBPA1 initiates anthocyanin synthesis under low-temperature conditions in red-fleshed apples. *Plant J.*, **96**, 39–55. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.14013>.

**Woodward, J.R.** (1972) Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 465–473. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740230406>.

**Xie, Y., Tan, H., Ma, Z. and Huang, J.** (2016) DELLA Proteins Promote Anthocyanin Biosynthesis via Sequestering MYBL2 and JAZ Suppressors of the MYB/bHLH/WD40 Complex in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant*, **9**, 711–721. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205216000332>.

**Xu, W., Dubos, C. and Lepiniec, L.** (2015) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–

bHLH–WDR complexes. *Trends Plant Sci.*, **20**, 176–185. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138514003124>.

**Zhang, Y., Yin, X., Xiao, Y., et al.** (2018) An ETHYLENE RESPONSE FACTOR-MYB Transcription Complex Regulates Furaneol Biosynthesis by Activating QUINONE OXIDOREDUCTASE Expression in Strawberry. *Plant Physiol.*, **178**, pp.00598.2018. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.18.00598>.

**Zhang, Z., Shi, Y., Ma, Y., et al.** (2020) The strawberry transcription factor FaRAV1 positively regulates anthocyanin accumulation by activation of FaMYB10 and anthocyanin pathway genes. *Plant Biotechnol. J.*, 1–13

**Additional file 1:** Complete data from Liquid chromatography-mass spectrometry analysis normalized with internal standard and fresh weight. A total of eight replicates were used in each condition.

**Data available on the electronic version of the thesis.**



## CHAPTER 3

**Azacitidine treatment provides evidence that DNA methylation governs strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening**

This chapter has been submitted to *Frontiers in Plant Science* as:

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Molina-Hidalgo FJ, Caballero JL, Perez de Souza L, Alseekh S, Fernie AR, Muñoz-Blanco J, Rodríguez-Franco A. 2021. Azacitidine treatment provides evidence that DNA methylation governs strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening.

**Azacitidine treatment provides evidence that DNA methylation governs strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening.**

**Abstract**

The repetitive injection of the hypomethylating compound N5-Azacytidine (AZA) into green and unripe *Fragaria × ananassa* receptacles led to a substantial delay in the ripening of this fruit. This delay was reversible, as the fruits become fully ripen after few days of cessation of the AZA treatment. This observation is notably the opposite of that described in other fleshy and climacteric fruits where the spraying of surfaces of the fruits with AZA promoted their ripening. This clearly indicates that DNA methylation also governs the ripening of strawberries. An RNA-Seq analysis done with tissues treated with AZA versus water-treated controls showed over 3275 and 1685 genes up and down regulated, respectively. Many key genes responsible for the biosynthesis of anthocyanins, phenylpropanoid and hormones, like abscisic acid (ABA) were affected by the treatment. For ABA, those genes involved in the final steps of its biosynthesis were down-regulated, and those responsible for its withdrawal either by degradation or conjugation were up-regulated after the AZA treatment. Similar situations occurred with genes involved in the biosynthesis of anthocyanins and phenylpropanoids. Many transcription factors mediating the ripening were also down-regulated in the AZA treated tissues. Taken together all these observations suggest that the ripening of the strawberry receptacle is governed by the 5mC-methylation and demethylation of a still unknown group of genes, and that diffusible factors could participate in the ripening process.

## Introduction

The cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) is an important fruit having a quality and aftermarket shelf life that is strongly linked to the ripening process (Giampieri *et al.*, 2014). Fruit development and ripening involve irreversible biochemical and genetic processes leading to an edible and desirable soft receptacle as part of a strategy for seed dispersal (Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013). These changes are governed by different factors such as hormones, temperature, light, and genotype, and depend on the expression of a set of ripening related genes. How all these factors interact with each other in this process is a very active field of investigation in strawberry nowadays (Concha *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2016; Chai *et al.*, 2011). In addition to the appearance of the red color, many organoleptic changes occurs in the ripening phase, such as the accumulation of sugars, soluble acids and secondary metabolites responsible for the of aroma and flavor as well as the alteration of the fruit cell shape, firmness and texture (Moya-León *et al.*, 2019).

Most transcriptomic research on ripening has been done in climacteric fruits such as bayberry (Feng *et al.*, 2012), banana (Yun *et al.*, 2019), peach (Pei *et al.*, 2019), pear (Xie *et al.*, 2013), kiwifruit (Zhang *et al.*, 2018), apricot (Q., Zhang *et al.*, 2019), grape (Guo *et al.*, 2019), apples (Zhang *et al.*, 2015; Busatto *et al.*, 2017) and tomato (Osei *et al.*, 2017; Belouah *et al.*, 2020). By contrast, the transcriptomic studies on non-climacteric fruit are scarce and limited to fewer plants such as orange (Yu, *et al.*, 2012), pepper (Lee *et al.*, 2010), jujube (Z., Zhang *et al.*, 2019), grape (Deluc *et al.*, 2007; Balic *et al.*, 2018; Tornielli *et al.*, 2012) and strawberry (Medina-Puche *et al.*, 2016; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). Hormonal control of the ripening process in strawberry is starting to be disclosed. In non-climacteric plants, ethylene, which plays a major role in the ripening of climacteric fruits, has little or null effects on ripening (Merchante *et al.*, 2013; Villarreal *et al.*, 2010; Concha *et al.*, 2013). In strawberry, the auxin/ABA content ratio controls the development and ripening of the fruit (Symons *et al.*, 2012; Estrada-Johnson *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2011). The auxin indole-3-acetic acid (IAA), synthesized mainly by fertilized achenes, is responsible for the development and growth of the fruit while at the same time arrests ripening (Nitsch, 1950; Given *et al.*, 1988; Perkins-Veazie, 1995; Symons *et al.*, 2012). Therefore, immature receptacles with detached or unfertilized achenes does not grow and advance their ripening. This is reversed by the application of exogenous auxin (Nitsch, 1950). The various active forms of gibberellic also play a critical role in the development of the fruit, being responsible mainly for the cell expansion taking place after cell divisions and also seems to arresting ripening (Csukasi *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 1996). ABA is synthesized once the fruit has fully developed in size and when auxins and gibberellic acid decay, being the main responsible for the final ripening (Symons *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2011). Therefore, a raise in ABA contents either by an exogenous application or by submitting plants to drought stress promotes a

premature ripening, whereas the depletion of ABA by silencing or inhibiting the *FaNCED1* gene, responsible for its biosynthesis, contributes to an important delay in this process (Jia *et al.*, 2011). Ripening in all kind of fruits is also regulated by epigenetic marks (Teyssier *et al.*, 2015; Gallusci *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2019).

A comprehensive knowledge of development and ripening therefore requires analysis of methylation in genes and other epigenetic marks such as those involving histones. This epigenetic regulation is mainly described in tomato fruit (Ecker, 2013; Zhong *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015), where the demethylation of the promoter and bodies of the *Cnr*, *Rin* and *Nor* genes, all of them strongly related to an ethylene-dependent ripening, takes place mainly through the intervention of the *SIDMR2* demethylase (Zhong *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Methylation marks can also be lost as result of a decay in the activity of *de novo* and maintenance DNA methyltransferases (Furner and Matzke, 2011). This seems to be the case in strawberries, where a lower degree of the DNA methylation in mature fruits compared with immature is linked to a decay in the activity of the RdDM pathway (Cheng *et al.*, 2018). In this latter work however, a different effect of AZA on ripening was attained, as the spraying of surfaces with this compound resulted in an advancement of ripening. The number and the nature of the genes directly regulated by differential methylation along the ripening in strawberry is still unknown. In addition, to the extent of our knowledge, no transcriptomic analysis has ever been performed in strawberry receptacles treated with AZA.

DNA methylation patterns change dramatically after the application of either hyper- or hypo-methylating drugs. 5-Azacytidine (AZA) is a chemical able to induce a general and nonspecific DNA hypomethylation (Veselý and Čihák, 1978). This compound acts as a cytidine analogue, after its metabolization to 5-aza-2'-deoxycytidine-triphosphate, replaces cytosine during DNA replication. The AZA-derived bases incorporated into DNA cannot incorporate DNA methylation marks, and these will be lost during DNA replication. In addition, AZA-derived bases will covalently bind to the DNA methyltransferases, and these are eventually degraded (Veselý and Čihák, 1978; Santi *et al.*, 1984; Stresemann and Lyko, 2008).

AZA has been used to unravel how the loss of DNA methylation marks could affect the development and ripening of many fruits. When added to cultured orange cells, a down-regulation of some genes pertaining to the carotenoid biosynthesis pathway along an up-regulation on those involved in its degradation take place. Consequently, there is a decline of carotenoids and hence of the ABA contents that is linked to a loss of the orange color (Xu *et al.*, 2017). The spraying of fruit surfaces with AZA seems to accelerate ripening in both, climacteric and non-climacteric fruits. Therefore, AZA sprayed to grape surfaces results in an early ripened phenotype linked to

an increase of glucose, soluble acids, and anthocyanins (Guo *et al.*, 2019). This also occurs when green tomatoes are treated with AZA (Zhong *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). In addition, the surface application of this compound to apples and peaches induced an advanced ripening and the early appearance of red pigments in both fruits (Zhu *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2018). Finally, early ripening has also been observed when strawberry fruit surfaces are sprayed with AZA (Cheng *et al.*, 2018).

In the current work, we describe the unexpected and striking observation of a reversible delay in the ripening of strawberry receptacles when 1mM AZA was repeatedly injected into the fruit. This application of AZA was done in halves of fruit receptacles that received parallel injections of water as control in the other half of the same fruit. The so treated receptacles were left to ripen until the water treated part was fully mature. Thus, both tissues, treated or not with AZA, were analyzed through RNA-Seq. This revealed that not only changes related to the red color formation took place in AZA treated tissues, but also a true delay in the ripening. Many transcripts and metabolites associated to hormone biosynthesis, aroma, flavor and texture were either reduced or not detected in the AZA treated parts. This included the expression of many important transcription factors (TFs) involved in ripening. Key and critical genes pertaining to the ABA biosynthetic pathway were down-regulated, while at the same time those involved in its biological withdrawal, either by its degradation or inactivation via conjugation, were up-regulated. The contents of the free and biologically active form of ABA were substantially reduced, whereas that of inactive and conjugated ABA increased notably in the AZA treated parts. Products coming from the degradation of ABA were also noticeably present at higher concentrations in AZA treated parts. Genes related to auxins and gibberellin biosynthesis pathways were however up-regulated, and so did the contents of these ripening inhibitory hormones. That a general delay of the ripening took place was also confirmed by metabolomic studies, where many compounds found in red receptacles were found at low levels in AZA treated parts.

These results strongly indicate that m5C methylation status of DNA governs strawberry fruit ripening by mainly controlling hormone content, giving further and strong support that auxin/ABA ratio as the main force regulating the ripening of this fruit. Data suggest that ripening could be governed by a change in the methylation status of a reduced number of regulatory genes, and that there might be diffusible components that can spread through the receptacle that are contributing to the ripening.

## Results

### 5-azacytidine delayed strawberry ripening promoting changes in transcriptome

The injection of AZA to halves of immature strawberry receptacles at the G3 green stage was accompanied by a strong delay in the formation of the red color in the receptacle (Fig 1A). G3 stage corresponds to immature fruits that are high in firmness and fully developed in size but are still green with no traces of red pigments. This delay was only observed in the AZA treated parts, whereas the rest of the receptacle, treated with water, ripened at a regular pace, reaching the red and overripe stages normally. The AZA treated parts remained white as far as the treatment was repeated every other day. Once we abandoned the AZA treatment at any time, those parts turned red and ripened normally (Fig 1B). RNA-Seq analysis was performed to explore changes in the transcriptome in the AZA treated tissues versus the control. A total of 3275 and 1685 genes were down and up-regulated respectively (Additional file 1) after applying the filtering indicated in the Materials and Methods section.



**Fig 1.** (A) AZA treated strawberry fruit receptacles. (B) Treated fruits after abandoning AZA treatment. Fruits were collected at the green G3 stage (fully developed green receptacles) and kept with pedicels submerged in a Murashige and Skoog media solution, then a 1mM solution of AZA was injected to halves of the fruits every other day. These parts remained white while the other halves were injected with water and used as control ripen at a regular pace acquiring the red color characteristic of mature receptacles.

### AZA treatment blocks anthocyanin biosynthesis.

Many key genes pertaining to the anthocyanin pathway were down-regulated or not induced in the AZA treated tissues. These included *FaGT1* coding an essential anthocyanidin glucosyltransferase (*FvH4\_7g33480*) (Griesser *et al.*, 2008), *FaMalTransf* (*FvH4\_6g46740*) (Davik *et al.*, 2020) responsible for the biosynthesis of pelargonidin-3-glucoside and its malonyl derivative, both major anthocyanin components of the receptacle, and other key genes of this pathway, as *FaPAL* (phenylammonia lyase *FvH4\_6g16060*), *Fa4CL* (4-coumaryl-CoA ligase, *FvH4\_6g16460*), *FaDFR* (dihydroflavonol reductase, *FvH4\_2g39530*), *FaF3H* (flavone 3 hydroxylase, *FvH4\_1g11810*) and *FaANS* (antocyanin synthase, *FvH4\_5g01170*) (Almeida *et al.*, 2007; Moyano *et al.*, 1998; Griesser *et al.*, 2008). The expression of the phenylpropanoid structural genes were also down-regulated in the AZA treated parts, except for *FaANR* (*FvH4\_3g02980*), encoding an anthocyanin reductase which was expressed at higher levels (Table 1).

**Table 1.** Phenylpropanoid related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

Gene ID	log2 foldchange	p-value	Annotation
FvH4_6g16060	-1,242	1,48E-11	FaPAL
FvH4_3g40570	-0,375	2,67E-01	FaC4H
FvH4_6g16460	-6,399	5,30E-26	Fa4CL
FvH4_7g01160	-1,148	6,20E-03	FaCHS
FvH4_7g20870	0,366	5,87E-01	FaCHI
FvH4_1g11810	-2,389	5,90E-14	FaF3H
FvH4_2g39530	-3,968	2,82E-43	FaDFR
FvH4_5g01170	-1,558	7,17E-06	FaANS
FvH4_7g33840	-5,765	2,10E-20	FaUFGT
FvH4_6g46740	-3,242	3,80E-23	FaMalTransf
FvH4_6g34950	1,098	2,11E-01	FaF3H
FvH4_2g29990	-2,454	3,14E-20	FaFLS
FvH4_3g02980	6,599	4,13E-32	FaANR
FvH4_4g28110	-0,656	2,73E-02	FaLAR
FvH4_4g03650	-3,357	6,21E-11	FaUF3GT

### AZA treatments alter the expression of transcription factors regulating the strawberry ripening process

Many important and key genes coding for TFs involved in ripening had lower transcription levels in AZA treated tissues (Table 2). Among these, highlights *FaMYB10* (*FvH4\_1g22020*), which is described as a master regulator of the phenylpropanoid pathway responsible for the biosynthesis of many red-colored pigments (Medina-Puche *et al.*, 2014). Another lower expressed TF was *FaDOF2* (*FvH4\_2g14390*) which synergistically along with *FaEOBII* (*FvH4\_6g50930*), controls the expression of *FaEGS2* (*FvH4\_2g09110*, encoding eugenol synthase 2), a major enzyme involved in the biosynthesis of eugenol, an important phenylpropanoid volatile present in ripened strawberries that is responsible for the characteristic strawberry aroma (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017; Medina-Puche *et al.*, 2015). The TF *FaGAMYB* (*FvH4\_7g04470*) was also expressed at lower levels and its silencing by means of RNAi lead to white and un-ripened fruits (Vallarino *et al.*, 2015). Similar results were observed for *FaASR* (*FvH4\_2g13410*), a TF involved in sucrose metabolism that, after being silenced by means of RNAi, lead to immature and white fruits as well (Jia *et al.*, 2016).

The list of TF significantly down-regulated in AZA treated tissues that are usually induced throughout the ripening can be extended to *FaMADS9* (*FvH4\_6g46420*), which is responsible for the deposition of sugars and waxes along maturation (Vallarino *et al.*, 2020), *FaPRE1* (*FvH4\_3g04310*) whose silencing lead to the repression of ripening related genes (Medina-Puche *et al.*, 2019), and *FaSHP* (*FvH4\_6g37880*) whose silencing produced white receptacles. (Daminato *et al.*, 2013) (Table 2). Notably, AZA treatment induced the expression of *FaMYB9* (*FvH4\_2g31130*) and *FaMYB11* (*FvH4\_6g34650*) (Table 2). Both TFs are involved in the biosynthesis of proanthocyanidins, and are mainly expressed in immature and green receptacles (Schaart *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2016).



**Table 2.** Transcriptional factor extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>).

Gene ID	log2 foldchange	p-value	Annotation
FvH4_1g22020	-5,966	3,75E-53	FaMYB10
FvH4_6g50930	-5,102	2,09E-05	FaEOBII
FvH4_6g37880	-0,864	3,82E-02	FaSHP
FvH4_3g04310	-5,059	6,96E-36	FaPRE1
FvH4_2g14390	-6,660	9,04E-64	FaDOF2
FvH4_7g04470	-1,425	3,21E-05	FaGAMYB
FvH4_2g13410	-3,038	3,38E-21	FaASR
FvH4_6g46420	-1,027	1,82E-03	FaMADS9
FvH4_7g30100	-1,912	4,19E-03	FaSCL8
FvH4_2g31100	7,936	4,98E-08	FaMYB9
FvH4_6g34650	9,515	3,51E-13	FaMYB11

### AZA alters organoleptic related genes

During ripening, the expression of many genes associated with organoleptic changes involving color, aroma and firmness were altered in AZA treated tissues. Several genes coding for enzymes related to the formation of aroma volatiles were down-regulated in AZA treated parts, including *FaEGS2* (eugenol synthase 2, *FvH4\_2g09110*) (Araguez *et al.*, 2013), the alcohol acyl transferases *FaAAT1* (*FvH4\_7g18570*) and *FaAAT2* (*FvH4\_3g38880*) (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012) as well as *FaQR* encoding a quinone reductase (*FvH4\_6g50700*) (Raab *et al.*, 2006) (Table 3). Cell wall related genes behaved similarly. Along the ripening process, a set of cell wall modifying enzymes like *FaRGLyase* (rhamnogalacturonate lyase, *FvH4\_1g19200*), *FaPL* (pectate lyase, *FvH4\_2g19540*) and *FaPG* (polygalacturonate lyase, *FvH4\_7g15040*) (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Escobar *et al.*, 1997; Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Santiago-Domenech *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2009) have their onset of expression at ripe and over-ripe stage fruits. The transcripts coding for all these enzymes, as well as of beta-galactosidase, were found at lower levels in AZA treated tissues compared to the control parts. Transcription of genes expressed mainly in the green stages had higher expression levels in the AZA treated parts than in the control, like xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*FvH4\_5g05180*), and UDP-glucuronate 4-epimerase 1 (*FvH4\_5g05180*) (Usadel *et al.*, 2004).

**Table 3.** Organoleptic properties related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

Gene ID	log2 foldchange	p-value	Annotation
FvH4_2g09110	-1,534	1,01E-03	FaEGS2
FvH4_7g18570	-3,026	7,25E-04	FaAAT1
FvH4_3g38880	-6,250	5,64E-61	FaAAT2
FvH4_6g50700	-1,134	1,81E-54	FaQR
FvH4_4g33940	-1,359	8,15E-11	endo-1,4-beta-glucanase
FvH4_7g25860	-4,358	1,15E-08	expansin 2
FvH4_2g19540	-3,531	8,48E-11	FaPLB
FvH4_7g15040	-5,816	3,34E-48	FaPG2
FvH4_1g19200	-3,299	1,68E-06	FaRGlyase
FvH4_1g02100	3,544	6,10E-16	Glucuronidase 3 isoform 2
FvH4_4g10050	2,943	6,47E-06	UDP-glucuronate 4-epimerase 1
FvH4_5g05180	3,747	1,05E-04	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase

### AZA altered key genes involved in the biosynthesis of hormones

The transcription of many key genes involved in the biosynthesis of ripening-related hormones were expressed at lower levels in AZA treated parts. All the enzymes involved in ABA biosynthesis via its carotenoid precursors were down regulated. These included phytoene synthase (*FvH4\_6g38780*) zeaxanthin epoxidase (*FvH4\_1g16080*) neoxanthin synthase (*FvH4\_5g20670*), short chain dehydrogenase/reductase (*FvH4\_5g01930*), and abscisic-aldehyde oxidase (*FvH4\_3g26980*) (Table 4). There are two enzymes related to withdrawing bioactive ABA from within the cells, and they were both expressed at higher levels after the AZA treatment. These corresponds to ABA 8' hydroxylase (a cytochrome P450, *FvH4\_2g34420*), which irreversibly degrades ABA, and ABA beta-glucosyltransferase (*FvH4\_2g05690*), which inactivates ABA in a reversible reaction. The oxidative degradation of ABA initially catalyzed by the hydroxylase lead to the formation of 8'-hydroxy ABA, phaseic acid and dihydrophaseic acid (Perin *et al.*, 2018). The glycosylation of ABA forms the biologically inactive ABA glucose ester, which can be reversibly deconjugated through a  $\beta$ -glucosidase (Nambara and Marion-Poll, 2005).

**Table 4.** Abscisic acid related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

Gene ID	log2 foldchange	p-value	Annotation
<b>Abscisic acid biosynthesis</b>			
FvH4_3g26980	-2,688	4,08E-14	Abscisic-aldehyde oxidase (AO-3) (putative)
FvH4_5g20080	-3,672	1,37E-05	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic, Precursor (probable)
FvH4_1g23750	-5,672	2,92E-08	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic, Precursor (probable)
FvH4_1g16080	-2,633	5,29E-07	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic, Precursor (similar to)
FvH4_6g38780	-2,583	1,48E-09	Phytoene synthase, chloroplastic, Precursor (putative)
FvH4_3g05440	-2,002	1,18E-04	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED1, chloroplastic, Precursor (similar to)
FvH4_5g01930	-1,216	1,49E-04	Short chain dehydrogenase/reductase
FvH4_5g20670	-2,099	7,14E-05	NSY
<b>Abscisic acid hydroxylase</b>			
FvH4_2g34420	3,142	8,61E-07	
FvH4_5g25150	4,267	1,03E-05	
FvH4_2g06010	8,025	9,24E-13	
<b>Abscisate beta-glucosyltransferase</b>			
FvH4_2g05690	3,266	3,30E-32	

Auxins are synthesized following two different pathways. One uses tryptophan as a precursor (Mano and Nemoto, 2012). Both pathways are expressed at higher levels in the AZA treated tissues. Transcripts levels of Trp decarboxylase I (*FvH4\_3g09540*) and amidase I (*FvH4\_2g01730*), two of the key enzymes for auxin biosynthesis, were expressed at higher levels in AZA treated parts, as well as *YUCCA10* (*FvH4\_2g24750*), a gene coding for a flavin-monoxygenase involved in auxin biosynthesis. Auxin receptors as *FaPIN1* (*FvH4\_5g17310*), *FaPIN4* (*FvH4\_4g32450*), and *FaPIN5* (*FvH4\_6g00660*) were also expressed at higher levels, as well as those genes involved in the conjugation of auxin (Table 5).

**Table 5.** Auxin related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

Gene ID	log2 foldchange	p-value	Annotation
			<b>Synthesis</b>
FvH4_2g01730	7.290	2.13E-18	Amidase1
FvH4_2g24750	1.824	3.57E-06	FaYUC10
FvH4_3g09540	9.324	1.73E-07	Trp decarboxylase
			<b>Transport</b>
FvH4_5g17310	4.241	1.54E-12	FaPIN1
FvH4_4g32450	1.896	1.03E-12	FaPIN4
FvH4_6g00660	3.869	4.63E-06	FaPIN5
FvH4_2g26410	2.633	6.75E-06	FaAUX/LAX3
			<b>Conjugation</b>
FvH4_2g04750	3.324	1.66E-04	FaGH3.1
FvH4_6g44990	4.385	6.60E-05	FaGH3.5
FvH4_2g24250	2.872	5.37E-24	FaGH3.6a
FvH4_2g25330	2.831	6.87E-06	FaGH3.9
FvH4_4g22430	2.123	3.29E-07	FaGH3.17
FvH4_1g06730	0.516	7.94E-03	FaIAR3

Some genes related to gibberellins biosynthesis were also up-regulated in AZA treated tissues, as is the case of gibberellin-3-beta-dioxygenase I (*FvH4\_2g30040*) and IV (*FvH4\_3g36530*) as well as some gibberellin receptors (*FvH4\_2g06540*, *FvH4\_2g06530*). In contrast, transcript levels of enzymes involved in gibberellin degradation such as gibberellin 2 beta dioxygenase (*FvH4\_4g14690*), were slightly down-regulated in the AZA treated parts (Table 6).

**Table 6.** Gibberellin related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

Gene ID	log2 foldchange	p -value	Annotation
<b>Synthesis</b>			
FvH4_2g30040	6.204	2.57E-03	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1 (AtGA3ox1) (probable)
FvH4_2g30020	3.647	1.02E-02	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1 (AtGA3ox1) (probable)
FvH4_2g30010	6.672	4.75E-06	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1 (AtGA3ox1) (probable)
FvH4_6g30780	3.897	9.18E-10	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1 (AtGA3ox1) (putative)
FvH4_3g28220	3.134	7.14E-14	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 4 (AtGA3ox4) (probable)
FvH4_3g36530	4.517	4.44E-03	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 4 (AtGA3ox4) (probable)
FvH4_6g42670	1.111	1.33E-03	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 4 (AtGA3ox4) (probable)
FvH4_3g36530	4.517	4.44E-03	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 4 (AtGA3ox4) (probable)
<b>Degradacion</b>			
FvH4_4g14690	2.066	5.41E-02	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8 (probable)
FvH4_3g38920	2.583	2.78E-06	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8 (probable)
<b>Receptors</b>			
FvH4_2g06540	8.473	2.28E-11	Probable gibberellin receptor GID1L2
FvH4_2g06530	8.295	2.27E-08	Probable gibberellin receptor GID1L2
FvH4_4g15010	7.454	4.15E-09	Probable gibberellin receptor GID1L2
FvH4_3g28600	7.423	2.10E-03	Probable gibberellin receptor GID1L3
FvH4_7g04040	7.050	9.24E-04	Probable gibberellin receptor GID1L3
FvH4_6g21100	6.732	4.89E-08	Probable gibberellin receptor GID1L2
FvH4_2g06490	5.685	2.51E-09	Probable gibberellin receptor GID1L1
FvH4_2g06400	4.068	1.31E-05	Probable gibberellin receptor GID1L2
FvH4_4g27710	4.190	1.97E-05	Probable gibberellin receptor GID1L3

### Metabolic analysis shows differences between treated and non-treated part

A profiling of the primary metabolism content was next performed in AZA treated and control parts. AZA-treated tissues had higher levels of phenylalanine, isoleucine, and lysine than control tissues. These amino acids accumulate in the green stages and decrease along the ripening (Merchante *et al.*, 2013; Vallarino *et al.*, 2020). Asparagine, proline, and threonine were also present at higher concentrations in the AZA treated parts. This pattern was also followed by putrescine and glucose 6-phosphate, which clearly accumulated in the AZA treated part at higher concentrations than in the control red part. These content patterns are similar to that found in the ripening process (Merchante *et al.*, 2013) (Table 7), demonstrating that the metabolite profile of AZA treated parts is similar to the white stages of ripening than to mature fruits. Glucose, fructose, and sucrose are the main sugars present in strawberry receptacles, with concentrations increasing along ripening (Jia *et al.*, 2013). In AZA treated tissues, we found half of sucrose concentrations relative to the control. This could be due to lower transcript levels of sucrose-6-phosphate synthase (*FaSPS*, *FvH4\_2g04920*, *FvH4\_2g28820*) sucrose synthase (*FaSUS*, *FvH4\_2g26000*) and the sucrose transporter (*FaSUT*, *FvH4\_5g33660*) (Table 8). No significant variation of fructose and glucose were found (Table 7).

**Table 7.** Changes in primary metabolism in AZA treated parts relative to the control. Data are normalized to the mean response calculated for controls in GC-MS chromatogram area normalized to internal standard ribitol. Values presented are fold change means $\pm$ SE of three biological replicates. Values in bold denote significant differences as determined by t-test analysis ( $p < 0.05$ ). The colors indicate the proportional content of each identified metabolite among the samples. Lower values are depicted at different red intensities and higher at different green intensities.

Alanine	1.20 $\pm$ 0.05	Maltose	0.63 $\pm$ 0.06
Arginine	1.05 $\pm$ 0.13	Methionine	<b>1.89<math>\pm</math>0.11</b>
Asparagine	<b>1.62<math>\pm</math>0.03</b>	Phenylalanine	<b>3.17<math>\pm</math>0.10</b>
Aspartic acid	1.46 $\pm$ 0.05	Phosphoric acid	0.93 $\pm$ 0.02
Citric Acid	1.13 $\pm$ 0.03	Proline	1.47 $\pm$ 0.10
Dehydroascorbic acid	1.12 $\pm$ 0.03	Putrescine	<b>3.18<math>\pm</math>0.35</b>
Fructose	0.80 $\pm$ 0.01	Pyroglutamic acid	0.91 $\pm$ 0.04
Fumaric acid	1.09 $\pm$ 0.08	Pyruvic acid	1.22 $\pm$ 0.09
Glucose	0.75 $\pm$ 0.02	Raffinose	1.14 $\pm$ 0.56
Glucose-6-phosphate	<b>2.12<math>\pm</math>0.12</b>	Rhamnose	<b>0.72<math>\pm</math>0.05</b>
Glutamic Acid	1.29 $\pm$ 0.07	Serine	1.28 $\pm$ 0.05
Glutamine	1.02 $\pm$ 0.04	Succinic acid	1.30 $\pm$ 0.04
Glycine	1.05 $\pm$ 0.04	Sucrose	<b>0.49<math>\pm</math>0.01</b>
Histidine	1.28 $\pm$ 0.28	Threonic Acid	<b>1.87<math>\pm</math>0.14</b>
Isoleucine	<b>2.13<math>\pm</math>0.26</b>	Threonine	1.39 $\pm$ 0.07
Leucine	<b>0.52<math>\pm</math>0.04</b>	Tyrosine	0.96 $\pm$ 0.03
Lysine	<b>2.27<math>\pm</math>0.05</b>	Valine	<b>1.84<math>\pm</math>0.08</b>
Malic Acid	0.62 $\pm$ 0.01	Xylose	0.69 $\pm$ 0.04

**Table 8.** Sucrose related genes extracted from total RNAseq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database ()

Gene ID	log2 foldchange	p-value
<b>Sucrose transporters</b>		
FvH4_5g33660	-1.25	7.91E-06
FvH4_2g12320	-0.59	5.11E-01
<b>sucrose-6-phosphate synthase</b>		
FvH4_2g28820	-2.30	1.37E-05
FvH4_2g04920	-3.93	2.78E-13
FvH4_4g13520	-1.85	5.42E-07
FvH4_6g48900	-2.77	1.43E-03
<b>Sucrose synthase</b>		
FvH4_2g26000	-1.01	4.69E-03

### Effects of AZA in secondary metabolism

We subsequently identified the major soluble phenolic compounds by LC-MS in the AZA and control tissues. As expected, anthocyanin pelargonidin-3-glucose, the main compound responsible for the red color (Aaby *et al.*, 2007; La Barbera *et al.*, 2017), as well as pelargonidin-3-(6'-malonylglucoside), pelargonidin-3-rutenoside, pelargonidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-glucose, cyanidin-3-(6'-malonylglucoside) and cyanidin-3-rutenoside were all either detected at negligible levels or were not detected in AZA treated parts (Table 9). were found at negligible levels or were even missing in AZA treated parts (Table 9). Cyanidins are a group of anthocyanins found in strawberry receptacles.

In red fruits, pelargonidin are found at higher levels than cyanidin. Major flavonols found in strawberry receptacles, all kaempferol or quercetin derivatives, were mostly present at lower levels in AZA treated samples (Table 8). A higher concentration of dimers and trimers of pelargonidin and cyanidin, as well as proanthocyanins have been found in AZA treated parts (Table 9). These compounds are synthesized and accumulated in the green stages and are catabolized to produce the anthocyanin monomers that accumulate during ripening (Schaart *et al.*, 2013). The building blocks of proanthocyanins, (epi)afzelecin and epi(catechin), were also present at higher levels in treated parts (Table 9).

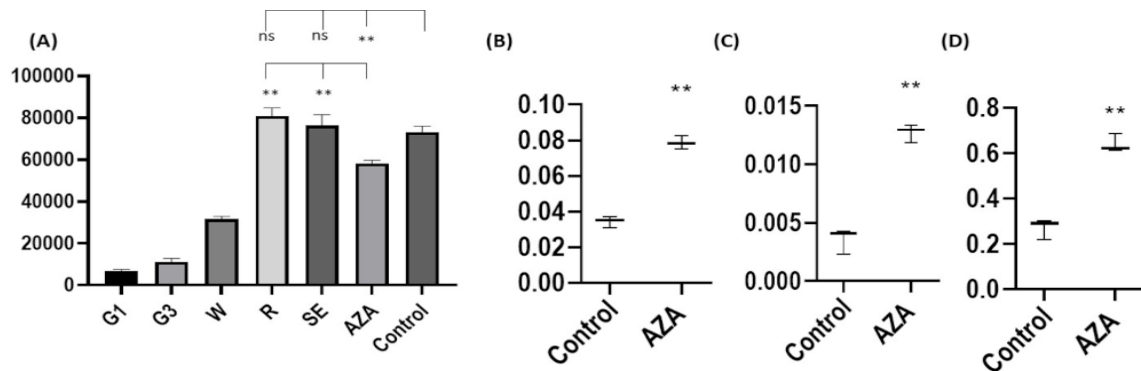
**Table 9.** Changes in secondary metabolism in AZA treated parts relative to the control. Data are normalized to the mean response calculated for controls. Values presented are fold change means $\pm$ SE of three replicates. Values in bold denote significant differences as determined by t-test analysis ( $P < 0.05$ ). The colours indicate the proportional content of each identified metabolite among the samples. Lower values are depicted at different red intensities and higher at different green intensities.

(epi)afzelechin	<b>2.70<math>\pm</math>0.39</b>	Pelargonidin-3-malonylglucoside	<b>0.01<math>\pm</math>0.00</b>
(epi)catechin	<b>2.60<math>\pm</math>0.38</b>	Pelargonidin 3-5 diglucoside	<b>0.02<math>\pm</math>0.00</b>
(Epi)catechin hexose	0.72 $\pm$ 0.10	Phaseic acid	<b>2.26<math>\pm</math>0.10</b>
ABA	<b>0.55<math>\pm</math>0.05</b>	Proanthocyanidin trimer	1.35 $\pm$ 0.09
ABA-glucoside	<b>3.59<math>\pm</math>0.21</b>	ProanthocyanidinB3	1.28 $\pm$ 0.09
Agrimoniin(sanguin)	1.17 $\pm$ 0.20	Procyanidin B1	1.37 $\pm$ 0.08
Bis(HHDP)-glucose	1.35 $\pm$ 0.27	Procyanidin dimer (1)	<b>2.38<math>\pm</math>0.16</b>
Castalagin	1.36 $\pm$ 0.38	Procyanidin dimer (2)	1.38 $\pm$ 0.12
Cinnamic acid hexose	<b>0.23<math>\pm</math>0.00</b>	Procyanidin dimer (3)	1.33 $\pm$ 0.10
Coumaric acid hexose	<b>0.09<math>\pm</math>0.00</b>	procyanidin tetramer	1.57 $\pm$ 0.27
Cyanidin-3-glucose	<b>0.04<math>\pm</math>0.00</b>	Procyanidin trimer	1.42 $\pm$ 0.19
Cyanidin3-3malonylglucose	<b>0.12<math>\pm</math>0.01</b>	procyanidin trimer	1.65 $\pm$ 0.16
Cyanidin-3-rutenoside	<b>0.04<math>\pm</math>0.00</b>	ProcyanidinB2	1.17 $\pm$ 0.05
Dihydrophaseic acid	<b>2.22<math>\pm</math>0.27</b>	Propelargonidin dimer (1)	<b>0.48<math>\pm</math>0.05</b>
Dihydroxybenzoic acid	1.03 $\pm$ 0.08	Propelargonidin dimer (2)	1.16 $\pm$ 0.15
ellagic acid	1.94 $\pm$ 0.12	Propelargonidin dimer (3)	1.07 $\pm$ 0.14
Ferulic acid	<b>0.25<math>\pm</math>0.03</b>	Propelargonidin dimer (4)	<b>0.37<math>\pm</math>0.03</b>
Galloyl-bis(HHDP)-glucose	1.17 $\pm$ 0.18	Propelargonidin trimer (1)	1.66 $\pm$ 0.55
Hydroxybenzylhexose	0.99 $\pm$ 0.03	Propelargonidin trimer (2)	<b>0.37<math>\pm</math>0.06</b>
Kaempferol-3-malonylglucose	<b>0.13<math>\pm</math>0.06</b>	Quercetin-3-glucuronide	1.39 $\pm$ 0.17
Kaempferol-3-rutenoside	<b>0.05<math>\pm</math>0.00</b>	Quercetin-3-glucose	<b>0.53<math>\pm</math>0.07</b>
Kaempferol-3-acetylglucose	<b>0.04<math>\pm</math>0.01</b>	Quercetin acetylglucose	<b>0.15<math>\pm</math>0.09</b>
Kaempferol-3-coumarylglucose	<b>46.08<math>\pm</math>10.08</b>	Quercetin-3-malonylglucose	<b>0.10<math>\pm</math>0.05</b>
Kaempferol-3-glucose	<b>0.32<math>\pm</math>0.02</b>	Quercetin-3-rhamnoside	<b>0.43<math>\pm</math>0.12</b>
Naringenin chalcone hexose	<b>0.03<math>\pm</math>0.00</b>	Rutin	<b>0.23<math>\pm</math>0.02</b>
p-coumarylhexose	<b>0.15<math>\pm</math>0.00</b>	Sesquiterpenoid hexose	<b>0.13<math>\pm</math>0.00</b>
Pelargonidin-3-glucose	<b>0.03<math>\pm</math>0.00</b>	Sesquiterpenoid hexose	<b>0.15<math>\pm</math>0.01</b>
Pelargonidin-3-rutenoside	<b>0.03<math>\pm</math>0.00</b>	Sinaptic acid derivative	<b>0.01<math>\pm</math>0.00</b>
Pelargonidin-3-acetylglucoside	<b>0.001<math>\pm</math>0.0001</b>	Sinaptic acid hexose	<b>0.02<math>\pm</math>0.00</b>

### AZA treatment alters hormone contents

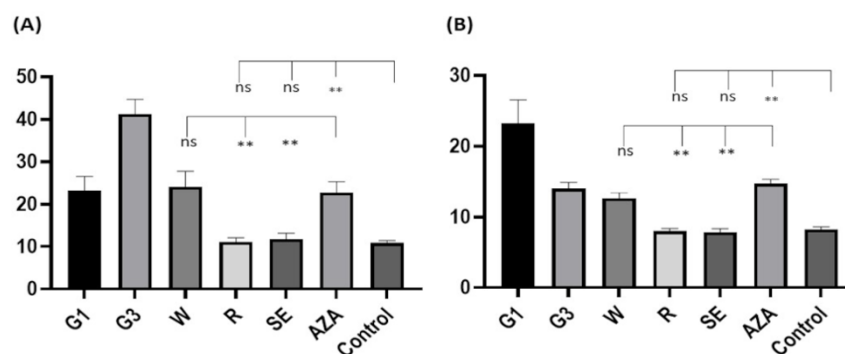
We determined hormones content in control and AZA treated tissues as well as in different ripening stages. Total ABA content (both free ABA and conjugated ABA) increased along ripening process, reaching maximum levels at the red stage (Fig 2A). A 30% reduction of total ABA contents was found in the AZA treated parts in relation to the controls (Fig 2A).

Notably, we observed higher levels of compounds coming from the degradation of ABA as phaseic acid, dihydrophaseic and that of conjugated ABA in AZA treated tissues (Fig 2B-D).



**Fig 2.** Relative hormone abundance throughout different stages of strawberry receptacle development and ripening. A. Total ABA (free + conjugated) B. Phaseic acid C. B-glucosyl-ABA (conjugated ABA) D. Dihydrophaseic acid. Y axis shows (A) means $\pm$ SE of total area of chromatography normalized by fresh weight and (B-D) means $\pm$ SE of total area normalized by fresh weight and internal standard isovitexin. Three biological replicates were used. \*\* statistical differences  $p < 0.05$  in ANOVA studies ns no statistical differences. G1, G3, W, R and SE stands for Green1, Green3, White, Red and Senescent receptacles, respectively.

Auxins exhibit an antagonist concentration pattern in relation to ABA along the different developmental and ripening stages. Auxins peaks at the G3 stage and reduces their contents in the red and senescent stages, being 400% less concentrated in the red than in the G3 stage (Symons *et al.*, 2012). When AZA was injected to strawberry fruits, the concentration of auxins remained the same as in the white stages, (Fig 3A). In control tissues, auxins levels dropped to concentrations similar to that found in red tissues. This pattern is followed for gibberellins which have their higher concentration at the G1 stage and diminish to lower levels at the G3 and W stages, and even lower in red and senescent stages. In the AZA treated part, the concentrations of gibberellins were higher than those found in the white stages and even higher than the red control tissues. The concentrations in the red parts are similar to the concentration in the non-treated red stage (Fig 3B).



**Fig 3.** Relative hormone abundance throughout different stages of strawberry receptacle development and ripening. A. Auxins (IAA) B. Gibberellins (GA4) Y axis shows the means $\pm$ SE of total area of chromatography, normalized by fresh weight. Three biological replicates were used. \*\* statistical differences  $p < 0.05$  in ANOVA studies ns no statistical differences. G1, G3, W, R and SE stands for Green1, Green3, White, Red and senescent receptacles, respectively.

## Discussion

### A global demethylation mediated by AZA delay strawberry fruit ripening

In all fleshy fruits analysed to date, a decay in the global 5mC levels takes place at the onset of the ripening, which coincides with a timely, specific and directed demethylation of a group of key and specific regulatory genes required for the fruit to mature. In tomato, this is mediated by specific demethylases such as SIDML2 (Liu *et al.*, 2015). In strawberry however, this demethylation decrease seems to be mediated by a general decay in the *de novo* and maintenance of the RdDM methylation pathway (Cheng *et al.*, 2018). The degree of methylation can also be altered using drugs that either methylate or demethylate DNA. This has been exploited in many cases to gain important information about different processes. 5-azacitidine (AZA) is a compound that can efficiently reduce or even eradicate all traces of m5C DNA methylation (Veselý and Čihák, 1978; Santi *et al.*, 1984; Lavelle *et al.*, 2008).

AZA has been widely used to alter DNA methylation patterns in plant tissues. For example, *Arabidopsis* seedlings treated with AZA presented an altered gene expression profile with the up-regulated expression of many transposable elements (Hudson *et al.*, 2011). Fruit tissues treated with AZA exhibited different results depending on the concentration as well as the mode and time of administration. AZA applied to the surfaces of tomatoes activated phytoene synthase expression triggering and accelerating fruit ripening (Zhong *et al.*, 2013). Surface application of AZA had also similar effects in apples and peaches, where an activation of the phenylpropanoid pathway and therefore a rise in the content of anthocyanins took place (Ma *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020). This also extended to strawberries, where an advancement of the ripening and the appearance of the red pigments was observed when AZA was sprayed to the surfaces of immature fruits (Cheng *et al.*, 2018). However, when AZA was injected into the commercial strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit receptacles, we observed the opposite phenotype. Injected AZA fulfilled a complete stop of the ripening process. The white stage of development was maintained as long as we keep injecting AZA into the fruit receptacle. This lack of color formation is similar to that of orange callus treated with AZA (Xu *et al.*, 2017). Such contrasting phenotypes are not a complete surprise when considering the complexity of spatiotemporal regulation of developmental processes affected by DNA-methylation. Injecting AZA can reach different tissue layers, including tissues possibly involved in ripening regulation. In addition, it has been reported a wide range of effects produced by AZA depending on the dose and time of exposition (Solís *et al.*, 2015).

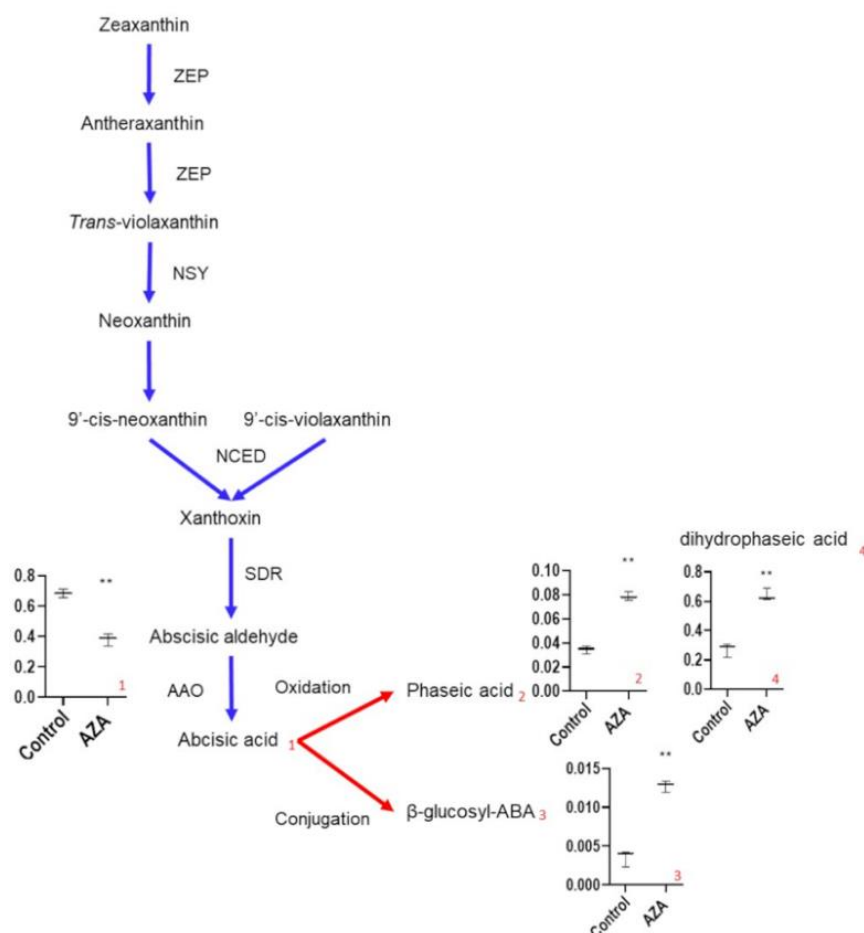
An interesting observation is that AZA did not kill the tissues, as these were able to resume normal development once the treatment ceased (Fig 1). Moreover, we hypothesise that



control tissues were driving the ripening of the AZA treated tissues, possibly through the diffusion of compounds produced by the former. Conjugated ABA has been described as both a form of reducing bioactive ABA from within the cells, but also of transporting it to nearby tissues through the xylem sap (Sauter *et al.*, 2002). In addition, the conjugated ABA accumulated into treated tissues could also be an additional source of the bioactive form of the hormone triggering the ripening. Another possibility is that the methylation status of the cells is being restored through unknown mechanisms. Further investigations are needed to clarify these observations and to attain deeper insight into the molecular mechanism that underlie them.

The AZA treated tissues remained white due to the downregulation of many genes coding for TF responsible for the biosynthesis of the red colored pigments such as *FaMYB10*, *FaGAMYB* and *FaSHP* (Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Vallarino *et al.*, 2015) (Table 2). A delay of the ripening process rather than only impairment of pigment production was supported by the down-regulation of many other ripening-related processes. These include the formation of aroma (*FaAAT1* and *FaAAT2*) (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012), volatile acids (*FaDOF2*, *FaEOBII* and *FaEGS2*) (Molina-Hidalgo *et al.*, 2017; Medina-Puche *et al.*, 2015; Araguez *et al.*, 2013), biosynthesis, and some implied in the cell-wall softening (*FaPG* and *FaRGLyase*) (Quesada *et al.*, 2009; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) (Table 3).

A delay of the ripening process is also suggested by the observed hormone profiles. Auxins and gibberellin both hormones able to arrest ripening, were present at higher levels in the AZA treated tissues. In contrast, ABA was present at lower concentrations in AZA treated tissues, with key transcripts involved in its biosynthesis being down-regulated whilst some of the transcripts responsible for its degradation or conjugation were up-regulated (Fig 4). As expected, this was accompanied by a substantial increase in the levels of conjugated ABA and its degradation products such as phaseic acid and the  $\beta$ -glucosyl-ABA (Fig 2).

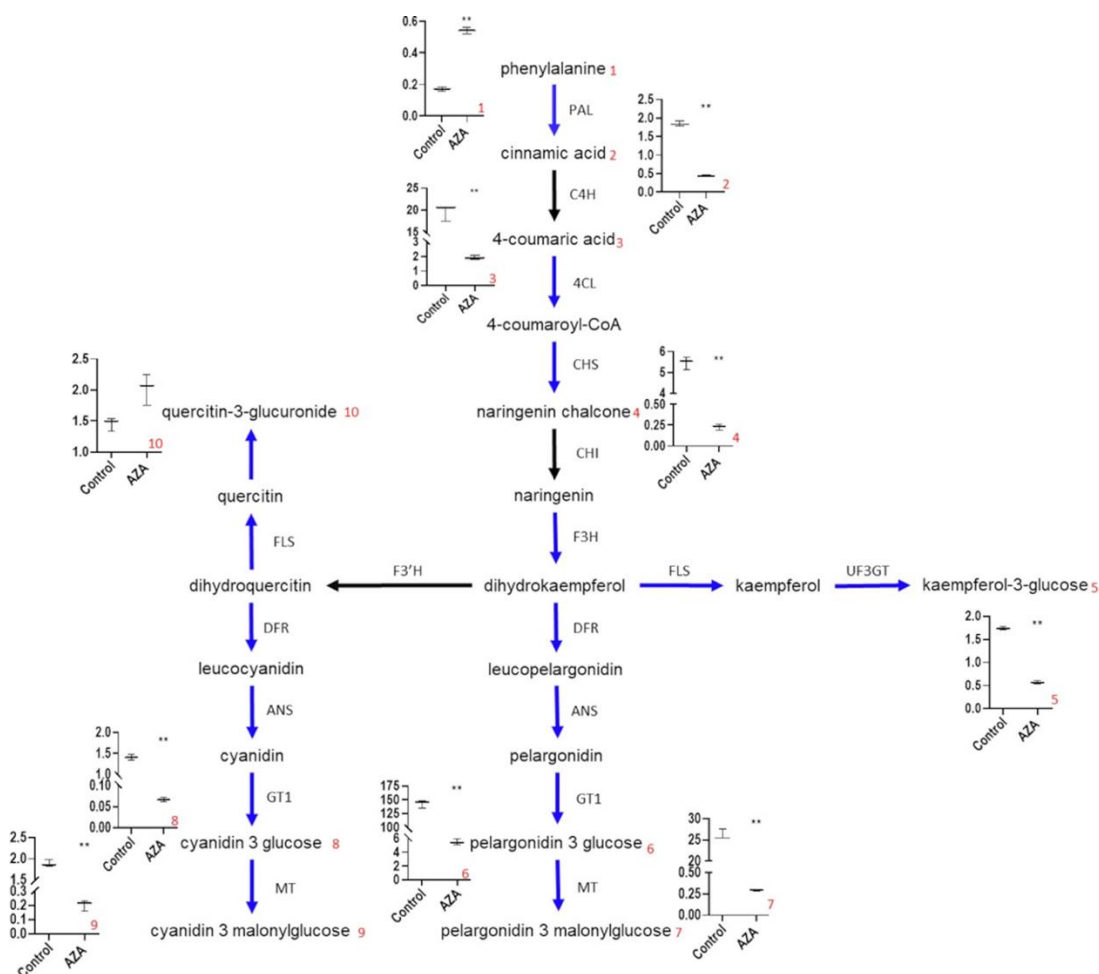


**Fig 4.** Schematic diagram of the ABA biosynthetic and degradation pathway. Enzymes that are down regulated due to AZA treatment are shown in blue, while up-regulated are shown in red. Boxplots show the levels of metabolites in control and treated receptacles, Y axis represent the means  $\pm$  SE of normalized area of each compound with internal standard isovitexin in LC-MS analysis. Three biological replicates were used. ZEP zeaxanthin epoxidase, NSY neoxanthin synthase, NCED 9'-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, SDR Short chain dehydrogenase reductase, AAO Abscisic aldehyde oxidase. Significant differences as determined by t-test analysis (\*\*) $p < 0.05$ .

Demethylation in the MYB10 promoter can trigger anthocyanin accumulation in other fruits (Ma *et al.*, 2018). *FaMYB10* induction was not observed in AZA injected strawberry fruits. An induction of this same TF was, however, observed when AZA was sprayed to the surface of apple and peach (Zhu *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2018) which can explain the appearance of the red color in these latter fruits. In strawberry, red pigmentation is conferred mainly by pelargonidin-3-glucoside and their derivatives, which accumulate in the receptacle throughout the ripening process (Aaby *et al.*, 2005; D'Urso *et al.*, 2016).

The phenylpropanoid pathway has been studied extensively and most of their enzymes are well characterized (Almeida *et al.*, 2007; Griesser *et al.*, 2008; Moyano *et al.*, 1998). During this process, phenylpropanoid and flavonols are present at low concentrations in unmaturing fruits but accumulate in the red and mature receptacles. Proanthocyanidins and condensed tannins are mainly present in the green stages (Aaby *et al.*, 2005; Buendía *et al.*, 2010; Schaart *et al.*, 2013).

AZA treated tissues have higher levels of proanthocyanins and condensed tannins, and reduced contents of anthocyanin and flavonols (Table 7). This reduction correlated with a decrease in the expression of genes coding for enzymes related to the biosynthesis of phenylpropanoids and flavonols such as *FaANS* (anthocyanidin synthase), *Fa3GT* (antocyanin glucosyltransferase), and *FaMalTransf* (antocyanin malonyltransferase) (Table 1, Fig 5). Low levels of anthocyanins are also present in *FaGAMYB* and *FaMYB10* RNAi-silenced fruits (Vallarino *et al.*, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2014), these TF levels are also lower after AZA treatment. The increase of proanthocyanins in treated tissues can be explained by the induction of *FaMYB9* (Schaart *et al.*, 2013).



**Fig 5.** Schematic diagram of the phenylpropanoid, flavonoid, and anthocyanin pathway. Enzymes that are down regulated due to AZA treatment are shown in blue. Boxplots show the levels of metabolites in control and treated receptacles; Y axis represent the normalized area of each compound with internal standard isovitexin and fresh weight in LC-MS analysis. Three biological replicates were used. PAL, phenylalanine lyase; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase; ANS, anthocyanidin synthase; C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; GT1, anthocyanin 3-glucosyltransferase; MT, malonyl transferase; UF3GT, UDP::flavonol 3 glucosyltransferase. Significant differences as determined by t-test analysis (\*\*)  $p < 0.05$ .

Along the strawberry fruit ripening, a decrease in the amino acid concentrations as well as that of putrescine and glucose-6-phosphate is observed (Merchante *et al.*, 2013; Vallarino *et*

*al.*, 2020). These compounds are found in higher concentration in the AZA treated parts than in the control (Table 8). The metabolic profile with AZA resembles that of fruits at early stages of ripening. Control tissues showed a normal amino acid profile. Sucrose has been described as an important regulator of strawberry fruit ripening (Jia *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). The addition of sucrose to strawberry fruits induces ripening via activation of *FaNCEDI*, a crucial gene responsible for the biosynthesis of ABA. This was accompanied by a repression of the genes responsible for the withdrawal of bioactive ABA, such as the ABA-glucosyltransferases. When the gene *FaSUTI*, coding for a sucrose transporter, is silenced by RNAi, strawberry fruits fail to ripen and do not turn to red (Jia *et al.*, 2013). Notably, AZA treated tissues have a substantial reduction in sucrose levels possible due to the down-regulation of its biosynthetic pathway genes, as well as *FaSUTI*, a glucose transporter (Table 8). Thus, those genes activated depending on the sucrose signalling, like *FaASR*, and *FaNCEDI*, were clearly down-regulated in the treated part, impeding the sucrose signalling in strawberry ripening and therefore not promoting ripening.

In strawberry, hormonal content is the key element controlling the ripening process. It has been proved that a disbalance on hormonal content would stop or accelerate the amount of time needed to fulfil ripening (Jia *et al.*, 2016). The ratio ABA/auxin and the fine control of the spatial/temporal biosynthesis of these hormones govern the whole process. Normally, ABA levels rises along the ripening process, having a peak at the fully red ripen receptacle (Fig 2A). Other hormones present at early stages of development, as gibberellin and auxins, have higher concentrations at the green/white stages (Symons *et al.*, 2012). Changes in the hormones content occurs when AZA was injected into fruits. Treated parts present auxin and gibberellin levels similar to those found in the green and white stages, while total ABA content (free ABA plus conjugated ABA) is around 30% lower than that found in red ripen receptacles. Hormone levels in control parts treated with water were similar to that found in untreated fruits at the red stages (Fig 2-C).

It has been proposed a model of an interlinked regulatory loop between ABA catabolism and gibberellin and auxin levels in strawberry receptacles (Liao *et al.*, 2018). According this model, and at the early stages of development, auxin levels would maintain high gibberellin levels in the strawberry receptacles. These will activate the expression of gene *FaCYP707A4a*, coding an enzyme involved in the degradation of ABA, and the repression of *FaNCED* responsible for the ABA biosynthesis. This situation (high auxin and gibberellic, low ABA contents) arrests the ripening. Similar phenotype on down-regulation of NCED enzymes and a less concentration of ABA content has been described on citrus callus treated with AZA (Xu *et al.*, 2017). Once the receptacle fully grows in size, auxins and gibberellin levels drop dramatically and this led to the biosynthesis of bioactive ABA. Thus, the ripening process triggers. When AZA was injected to

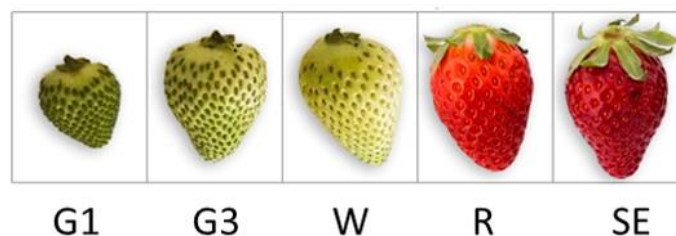
strawberry receptacles, we observed an increase in auxins and gibberellin that reached similar levels to that found in green and white stages of development. This was also accompanied by a reduction of the ABA content in the AZA treated part that was due to a lower biosynthesis and an enhanced withdrawal by means of oxidation and conjugation, suggesting that, as previously described, this loop between gibberellin and ABA levels is active in AZA treated parts arresting the normal ripening.

In summary, AZA treatment lead to the production of high levels of auxin and gibberellic, hormones able to arrest or inhibit the ripening. Noticeably, it also reduces the concentration of biologically active ABA because it represses those genes responsible for its biosynthesis and induces the two kind of activities responsible for its withdrawal as a bioactive form. This hormonal balance lead to a repression of many TFs implied in the ripening. And eventually many genes coding for the biosynthesis of pigments, aroma and cell-wall modifying enzymes depending upon these regulatory TFs are expressed at negligible or low levels. Whether these alterations are directly mediated by a loss of the demethylation at the promoter and/or bodies of these same genes, or indirectly by one or a set of regulatory master genes is still to be determined by running a whole genome bisulfite sequencing or a similar experiment.

## Material and methods

### Plant material

Strawberry plants (*Fragaria × ananassa* Duch. cv Fortuna, an octoploid and commercial cultivar) were grown under field conditions in the experimental farm “El Cebollar”, Moguer, Huelva, SW of Spain. Full sized fruits at the green stage were harvested along with their pedicels, which were submerged in Murashige and Skoog (MS) medium (Higuera *et al.*, 2019). Those fruits were kept in a plant chamber at 25 °C with a 16/8h light/dark period. Fruits at different stages of development and ripening were also harvested and immediately frozen in liquid nitrogen for transport and in -80 °C until use. Fig 6 shows the different stages used in this work.



**Fig 6.** Ripening stages used in this work. G1, G3, W, R and SE stands for Green1, Green3, White, Red and senescent receptacles, respectively.

### 5-azacytidine treatments

5-azacytidine (AZA, Sigma-Aldrich Cat N° A2385) was dissolved at 1 mM in sterile water. This solution was filtered through 0.22µm polyethersulfone filters and approximately 0.5 mL was carefully injected into the green strawberry receptacles using a HPLC syringe by introducing the needle around 0.3 to 0.5 cm into the fruit. Only half of each fruit was injected with AZA, whereas the opposite part of the same fruit received sterile water and were used as control. The AZA injections were repeated every other day for a total of 3-5 times until the water injected part of the fruit was fully ripened. Thus, both parts were separated with the use of a scalpel considering their color, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. Achenes were carefully removed from the surface of the frozen fruits with the help of a scalpel.

### RNA extraction

Total RNA was isolated and purified from 3 independent biological replicates in accordance with (Gambino *et al.*, 2008). Total RNA isolated was treated with DNaseI (RNase free; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were considered DNA-free when no amplicons corresponding to the analyzed genes were detected through PCR reactions.

### RNA-Seq and analysis of differentially expressed genes (DEGs)

An Illumina's TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit was used to prepare the libraries following the manufacturer's instructions. Briefly, each sample was enriched in mRNA by selection 3' poly(A) tails using poly(T) magnetic beads. Captured mRNAs were then converted into cDNA, and sequencing adaptors were added to their ends to make the molecules ready for sequencing. Samples were dual-indexed for post-sequencing demultiplexing. The fragment size distribution and concentration of the libraries were checked in an Agilent 2100 Bioanalyzer using the Agilent DNA 1000 kit. These were sequenced into a HiSeq-4000 Illumina platform as 2x100b paired-end sequences. A total of 50±10 million of reads were obtained for each one of the libraries which corresponded to approximately 40-50X coverage of the total haploid genome size. These were analyzed with FastQC (Babraham Informatics, 2018) and trimmed with Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) when required to get rid of low-quality bases and/or adaptors. Reads were then mapped to the fasta coding sequences corresponding to version 4.0.a1 of the *Fragaria vesca* genome (Edger *et al.*, 2018) using Kallisto v0.46.1; (Bray *et al.*, 2016). That *Fragaria* × *ananassa* reads can be mapped to the *Fragaria vesca* genome has been validated in many different occasions and is supported by the very high homology found between the two genomes (Medina-Puche *et al.*, 2016; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). Differential expression was then analyzed using the R package DESeq2 (Love *et al.*, 2014) after importing the data with the tximport package

(Soneson *et al.*, 2016). A threshold cut-off was set for genes differentially expressed using a  $\log_2\text{FoldChange} \geq 2$  or  $\leq -2$ , and an adjusted p-value  $\leq 0.01$ . The fasta sequences corresponding to the coding sequences for each of the genes were downloaded from the rosacea web page (<http://bit.ly/2uSHd2n>). Sequences and mapped data have been deposited in the public GEO database GSE151534. Additional file 1 depict the total RNA-seq results.

## **Metabolites and Hormones determination**

### **Primary metabolite determination**

Extraction and analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry performed using the same equipment set up and exact same protocol as described in (Lisec *et al.*, 2006). Briefly, frozen ground material from three biological replicates were homogenized in 300  $\mu\text{L}$  of methanol at 70 °C for 15 min and 200  $\mu\text{L}$  of chloroform followed by 300  $\mu\text{L}$  of water were added. The polar fraction was dried under vacuum, and the residue derivatized for 120 min at 37 °C (in 40  $\mu\text{L}$  of 20  $\text{mg ml}^{-1}$  methoxyamine hydrochloride in pyridine) followed by a 30 min treatment at 37 °C with 70  $\mu\text{L}$  of MSTFA. An autosampler Gerstel Multi-Purpose system (Gerstel GmbH & Co.KG, Mülheim an der Ruhr, Germany) was used to inject the samples into a gas chromatograph coupled to a time-of-flight mass spectrometer (GC-MS) system (Leco Pegasus HT TOF-MS (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 2 ml/s and gas chromatography was performed on a 30 m DB-35 column. The injection temperature was 230 °C and the transfer line and ion source were set to 250 °C. The initial temperature of the oven (85 °C) increased at a rate of 15°C/min up to a final temperature of 360 °C. After a solvent delay of 180 sec mass spectra were recorded at 20 scans s<sup>-1</sup> with m/z 70-600 scanning range. Mass chromatograms were evaluated using Chroma TOF 4.5 (Leco) and TagFinder 4.2 software.

### **Secondary metabolites determination**

Secondary metabolites were profiled using a Waters Acquity UPLC system coupled to the Q-Exactive Orbitrap mass detector according to the previously published protocol (Giavalisco *et al.*, 2009). The UPLC system was equipped with an HSS T3 C18 reversed phase column (100  $\times$  2.1 mm i.d., 1.8- $\mu\text{m}$  particle size; Waters) that was operated at a temperature of 40 °C. The mobile phases consisted of 0.1% formic acid in water (Solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (Solvent B). The flow rate of the mobile phase was 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and 2  $\mu\text{L}$  of sample was loaded per injection. The UPLC was connected to an Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) via a heated electrospray source (Thermo Fisher Scientific). The spectra were recorded using full scan mode of negative ion detection, covering a mass range from m/z 100 to 1500. The resolution was set to 25,000, and the maximum scan time was set to 250 ms. The sheath gas was

set to a value of 60, while the auxiliary gas was set to 35. The transfer capillary temperature was set to 150°C, while the heater temperature was adjusted to 300 °C. The spray voltage was fixed at 3 kV, with a capillary voltage and a skimmer voltage of 25 and 15 V, respectively. MS spectra were recorded from minute 0 to 19 of the UPLC gradient. Molecular masses, retention time, and associated peak intensities were extracted from the raw files using RefinerMS (version 5.3; GeneData), and Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Metabolite identification and annotation were performed using standard compounds, literature, and strawberry metabolomics references (Aaby *et al.*, 2005; Aaby *et al.*, 2007; Vallarino *et al.*, 2020; Merchante *et al.*, 2013; D'Urso *et al.*, 2016; Enomoto *et al.*, 2018; Perin *et al.*, 2018). Data are reported in a manner compliant with the standards suggested by (Fernie *et al.*, 2011).

### **Hormone determination**

About 200 mg of fresh-frozen materials from three biological replicates were used to extract and purify the hormones, as described by (Plackett *et al.*, 2012), with the following minor modifications: material was extracted with 80% acetonitrile containing 1% acetic acid (10 ml) for 1 h at 4 °C. After centrifugation at 3000 g for 20 min and collection of the supernatant, the residue was re-extracted by mixing with the same solvent, followed by centrifugation. The acetonitrile was evaporated, and the residue dissolved in 2 ml of water containing 1% acetic acid, followed by sonication for few minutes. The aqueous residue was loaded onto an OASIS HLB cartridge (60 mg, 3 cc; Waters) and prewashed/equilibrated consecutively with 3 ml of acetonitrile, methanol and 1% aqueous acetic acid. After washing with 1% aqueous acetic acid (3 ml), hormones were eluted with 80% acetonitrile containing 1% acetic acid (2 × 3 mL). The dried eluate was dissolved in 700 µL of water containing 1% acetic acid and passed through a SepPak silica cartridge (100 mg; Waters), prewashed with MeOH (2 × 700 µl) and 0.1 M HCl (700 µl). The extract was loaded onto an equilibrated MCX column, eluted by acetonitrile and evaporated. The residue was dissolved in 700 µL of water containing 1% acetic acid. The aqueous residue was loaded onto a Wash WAX solid-phase column after prewashing with MeOH and then 0.1 M NaOH, and then equilibrated by water. The column was then washed by MeOH and eluted by 80% acetonitrile containing 1% acetic acid, and the eluted fraction was evaporated and dissolved in 30 µL of water containing 1% acetic acid. The levels of hormones were quantified with the UPLC system coupled to a Triple Quad MS, as described in (Salem *et al.*, 2020). Statistical significance was tested with a Student's *t*-test using Graphpad 8.0.



## References

- Aaby, K., Ekeberg, D. and Skrede, G.** (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4395–4406.
- Aaby, K., Skrede, G. and Wrolstad, R.E.** (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4032–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884835>.
- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., et al.** (2000) Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *Plant Cell*, **12**, 647. Available at: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3870992>
- Almeida, J.R., D'Amico, E., Preuss, A., et al.** (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**, 61–71. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986107002317>.
- Araguez, I., Osorio, S., Hoffmann, T., Rambla, J.L., Medina-Escobar, N., Granell, A., Botella, M.A., Schwab, W. and Valpuesta, V.** (2013) Eugenol Production in Achenes and Receptacles of Strawberry Fruits Is Catalyzed by Synthases Exhibiting Distinct Kinetics. *Plant Physiol.*, **163**, 946–958. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.224352>.
- Babraham Informatics** (2018) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Balic, I., Vizoso, P., Nilo-Poyanco, R., et al.** (2018) Transcriptome analysis during ripening of table grape berry cv. Thompson Seedless P. Kalaitzis, ed. *PLoS One*, **13**, e0190087. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190087>.
- Barbera, G. La, Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., Zenezini Chiozzi, R. and Laganà, A.** (2017) Comprehensive polyphenol profiling of a strawberry extract (*Fragaria x ananassa*) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 2127–2142.
- Belouah, I., Bénard, C., Denton, A., et al.** (2020) Transcriptomic and proteomic data in developing tomato fruit. *Data Br.*, **28**, 105015. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235234091931371X>.
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L. and Muñoz-Blanco, J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.*, **54**, 633–645.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B.** (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120. Available at: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P. and Pachter, L.** (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.*, **34**, 525–527. Available at: <http://www.nature.com/articles/nbt.3519>.
- Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M. and Tomás-Barberán, F.A.** (2010) HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15

strawberry cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 3916–3926.

**Busatto, N., Tadiello, A., Trainotti, L. and Costa, F.** (2017) Climacteric ripening of apple fruit is regulated by transcriptional circuits stimulated by cross-talks between ethylene and auxin. *Plant Signal. Behav.*, **12**, e1268312. Available at: doi: 10.1080/15592324.2016.1268312.

**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.

**Cheng, J., Niu, Q., Zhang, B., Chen, K., Yang, R., Zhu, J.-K., Zhang, Y. and Lang, Z.** (2018) Downregulation of RdDM during strawberry fruit ripening. *Genome Biol.*, **19**, 212. Available at: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-018-1587-x>.

**Concha, C.M., Figueroa, N.E., Poblete, L.A., Oñate, F.A., Schwab, W. and Figueroa, C.R.** (2013) Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 433–444.

**Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., et al.** (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytol.*, **191**, 376–390.

**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. *J. Exp. Bot.*, **63**, 4275–4290. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers120>.

**D’Urso, G., Maldini, M., Pintore, G., d’Aquino, L., Montoro, P. and Pizza, C.** (2016) Characterisation of *Fragaria vesca* fruit from Italy following a metabolomics approach through integrated mass spectrometry techniques. *LWT - Food Sci. Technol.*, **74**, 387–395. Available at: [dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.061](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.061).

**Daminato, M., Guzzo, F. and 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**, 3775–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888065>.

**Davik, J., Aaby, K., Buti, M., Alsheikh, M., Šurbanovski, N., Martens, S., Røen, D. and Sargent, D.J.** (2020) Major-effect candidate genes identified in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) for ellagic acid deoxyhexoside and pelargonidin-3-O-malonylglucoside biosynthesis, key polyphenolic compounds. *Hortic. Res.*, **7**.

**Deluc, L.G., Grimplet, J., Wheatley, M.D., et al.** (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, **8**, 429. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034876>.

**Ecker, J.R.** (2013) Epigenetic trigger for tomato ripening. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 119–120. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2497>.

**Edger, P.P., VanBuren, R., Colle, M., et al.** (2018) Single-molecule sequencing and optical mapping yields an improved genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with chromosome-scale contiguity. *Gigascience*, **7**. Available at: doi/10.1093/gigascience/gix124/4739363.

**Enomoto, H., Sato, K., Miyamoto, K., Ohtsuka, A. and Yamane, H.** (2018) Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 4958–4965.

**Estrada-Johnson, E., Csukasi, F., Pizarro, C.M., et al.** (2017) Transcriptomic Analysis in Strawberry Fruits Reveals Active Auxin Biosynthesis and Signaling in the Ripe Receptacle. *Front. Plant Sci.*, **8**, 142–

149. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-8330.1974.tb00606.x>.

**Feng, C., Chen, M., Xu, C., Bai, L., Yin, X., Li, X., Allan, A.C., Ferguson, I.B. and Chen, K.** (2012) Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq. *BMC Genomics*, **13**, 19. Available at: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-19>.

**Fernie, A.R., Aharoni, A., Willmitzer, L., et al.** (2011) Recommendations for Reporting Metabolite Data. *Plant Cell*, **23**, 2477–2482. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.111.086272>.

**Furner, I.J. and Matzke, M.** (2011) Methylation and demethylation of the Arabidopsis genome. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 137–141. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526610001755>.

**Gallusci, P., Hodgman, T.C., Teyssier, E. and Seymour, G.** (2016) DNA methylation and chromatin regulation during fleshy fruit development and ripening. *Front. Plant Sci.*, **7**, 807.

**Gambino, G., Perrone, I. and Gribaudo, I.** (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.*, **19**, 520–525. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pca.1078>.

**Giampieri, F., Alvarez-suarez, J.M., Battino, M., Agrarie, S., Ambientali, A., Politecnica, U. and Ranieri, V.** (2014) Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 3867–3876.

**Giavalisco, P., Köhl, K., Hummel, J., Seiwert, B. and Willmitzer, L.** (2009) 13 C Isotope-Labeled Metabolomes Allowing for Improved Compound Annotation and Relative Quantification in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Metabolomic Research. *Anal. Chem.*, **81**, 6546–6551. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac900979e>.

**Given, N.K., Venis, M.A. and Gierson, D.** (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, **174**, 402–406. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF00959527>.

**Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M.L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Munoz-Blanco, J. and Schwab, W.** (2008) Redirection of Flavonoid Biosynthesis through the Down-Regulation of an Anthocyanidin Glucosyltransferase in Ripening Strawberry Fruit. *Plant Physiol.*, **146**, 1528–1539. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.114280>.

**Guo, D.L., Li, Q., Ji, X.R., Wang, Z.G. and Yu, Y.H.** (2019) Transcriptome profiling of “Kyoho” grape at different stages of berry development following 5-azaC treatment. *BMC Genomics*, **20**, 1–15.

**Higuera, J.J., Garrido-Gala, J., Lekhou, A., et al.** (2019) The Strawberry FaWRKY1 Transcription Factor Negatively Regulates Resistance to *Colletotrichum acutatum* in Fruit Upon Infection. *Front. Plant Sci.*, **10**. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00480/full>.

**Huang, H., Liu, R., Niu, Q., Tang, K., Zhang, B., Zhang, H., Chen, K., Zhu, J.-K. and Lang, Z.** (2019) Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **116**, 1430–1436. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1815441116>.

**Hudson, K., Luo, S., Hagemann, N. and Preuss, D.** (2011) Changes in Global Gene Expression in Response to Chemical and Genetic Perturbation of Chromatin Structure A. Imhof, ed. *PLoS One*, **6**, e20587. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020587>.

**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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.111.177311>.

**Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., Wang, B., Cui, L. and Fang, J.** (2016) Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnol. J.*, **14**, 2045–2065.

**Jia, H., Wang, Y., Sun, M., et al.** (2013) Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytol.*, **198**, 453–465.

**Lavelle, D., Sauntharajah, Y. and Desimone, J.** (2008) DNA methylation and mechanism of action of 5-azacytidine. *Blood*, **111**, 2485.

**Lee, S., Chung, E.-J., Joung, Y.-H. and Choi, D.** (2010) Non-climacteric fruit ripening in pepper: increased transcription of EIL-like genes normally regulated by ethylene. *Funct. Integr. Genomics*, **10**, 135–146. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10142-009-0136-9>.

**Liao, X., Li, M., Liu, B., Yan, M., Yu, X., Zi, H., Liu, R. and Yamamuro, C.** (2018) Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115**, E11542–E11550. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1812575115>.

**Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A.R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.*, **1**, 387–396. Available at: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.59>.

**Liu, R., How-Kit, A., Stammitti, L., et al.** (2015) A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, 10804–10809. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1503362112>.

**Love, M.I., Huber, W. and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**, 550. Available at: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>.

**Ma, C., Liang, B., Chang, B., Liu, L., Yan, J., Yang, Y. and Zhao, Z.** (2018) Transcriptome profiling reveals transcriptional regulation by DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine enhancing red pigmentation in bagged “granny smith” apples (*Malus domestica*). *Int. J. Mol. Sci.*, **19**.

**Mano, Y. and Nemoto, K.** (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.*, **63**, 2853–2872. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers091>.

**Martínez, G.A., Chaves, A.R. and Añón, M.C.** (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 × ananassa* Duch.). *J. Plant Growth Regul.*, **15**, 139–146.

**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., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., et al.** (2016) Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Funct. Integr. Genomics*, **16**, 671–692. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-016-0510-3>.

**Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., et al.** (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., Martínez-Rivas, F.J., Molina-Hidalgo, F.J., Mercado, J.A., Moyano, E., Rodríguez-Franco, A., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J. and Blanco-Portales, R.** (2019) An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle. *BMC Plant Biol.*, **19**, 586.

**Medina-Puche, L., Molina-Hidalgo, F.J., Boersma, M., et al.** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiol.*, **168**, 598–614. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931522>.

**Merchant, C., Vallarino, J.G., Osorio, S., et al.** (2013) Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *J. Exp. Bot.*, **64**, 4421–4439.

**Molina-Hidalgo, F.J., Franco, A.R., Villatoro, C., et al.** (2013) The strawberry (*Fragaria*×*ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1471–1483.

**Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Cañete-Gómez, C., et al.** (2017) The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J. Exp. Bot.*, **68**, 4529–4543. Available at: <http://academic.oup.com/jxb/article/68/16/4529/4067750/The-fruitspecific-transcription-factor-FaDOF2>.

**Moya-León, M.A., Mattus-Araya, E. and Herrera, R.** (2019) Molecular events occurring during softening of strawberry fruit. *Front. Plant Sci.*, **10**.

**Moyano, E., Portero-robles, I., Medina-Escobar, N., et al.** (1998) A Fruit-Specific Putative Dihydroflavonol 4-Reductase Gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol.*, **117**, 711–716.

**Nambara, E. and Marion-Poll, A.** (2005) ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 165–185. Available at: doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.

**Nitsch, J.P.** (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Am. J. Bot.*, **37**, 211–215. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1537-2197.1950.tb12183.x>.

**Osei, M., Danquah, A., Blay, E., Danquah, E. and Adu-Dapaah, H.** (2017) An overview of tomato fruit-ripening mutants and their use in increasing shelf life of tomato fruits. *African J. Agric. Res.*, **12**, 3520–3528. Available at: <http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/0714CAF67131>.

**Pei, M., Gu, C. and Zhang, S.** (2019) Genome-wide identification and expression analysis of genes associated with peach (*Prunus persica*) fruit ripening. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **246**, 317–327. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423818307738>.

**Perin, E.C., Crizel, R.L., Galli, V., Silva Messias, R. da, Rombaldi, C.V. and Chaves, F.C.** (2018) Extraction and Quantification of Abscisic Acid and Derivatives in Strawberry by LC-MS. *Food Anal. Methods*, **11**, 2547–2552.

**Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In *Horticultural Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 267–297. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650585.ch8>.

**Plackett, A.R.G., Powers, S.J., Fernandez-Garcia, N., et al.** (2012) Analysis of the Developmental Roles

of the Arabidopsis Gibberellin 20-Oxidases Demonstrates That GA20ox1, -2, and -3 Are the Dominant Paralogs. *Plant Cell*, **24**, 941–960. Available at: doi/10.1105/tpc.111.095109.

**Quesada, M.A., Blanco-Portales, R., Pose, S., et al.** (2009) Antisense Down-Regulation of the FaPG1 Gene Reveals an Unexpected Central Role for Polygalacturonase in Strawberry Fruit Softening. *Plant Physiol.*, **150**, 1022–1032. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.138297>.

**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**, 1023–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517758>.

**Salem, M.A., Yoshida, T., Perez de Souza, L., Alseekh, S., Bajdzienko, K., Fernie, A.R. and Giavalisco, P.** (2020) An improved extraction method enables the comprehensive analysis of lipids, proteins, metabolites and phytohormones from a single sample of leaf tissue under water-deficit stress. *Plant J.*, tpj.14800. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.14800>.

**Sánchez-Sevilla, J.F., Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., Posé, D., Merchante, C., Botella, M.A., Amaya, I. and Valpuesta, V.** (2017) Gene expression atlas of fruit ripening and transcriptome assembly from RNA-seq data in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Sci. Rep.*, **7**, 13737. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-14239-6>.

**Santi, D. V., Norment, A. and Garrett, C.E.** (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 6993–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6209710>.

**Santiago-Domenech, N., Jimenez-Bemudez, S., Matas, A.J., Rose, J.K.C., Munoz-Blanco, J., Mercado, J.A. and Quesada, M.A.** (2008) Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2769–2779. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ern142>.

**Sauter, A., Dietz, K.-J. and Hartung, W.** (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell Environ.*, **25**, 223–228. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.2002.00747.x>.

**Schaart, J.G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., et al.** (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol.*, **197**, 454–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157553>.

**Solís, M.-T., El-Tantawy, A.-A., Cano, V., Risueño, M.C. and Testillano, P.S.** (2015) 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Front. Plant Sci.*, **6**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00472/abstract>.

**Soneson, C., Love, M.I. and Robinson, M.D.** (2016) Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, **4**, 1521. Available at: <https://f1000research.com/articles/4-1521/v2>.

**Stresemann, C. and Lyko, F.** (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer*, **123**, 8–13.

- 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**, 4741–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791823>.
- Teyssier, E., Boureauv, L., Chen, W., Lui, R., Degraeve-Guibault, C., Stammitti, L., Hong, Y. and Gallusci, P.** (2015) Epigenetic regulation during fleshy fruit development and ripening. In *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Elsevier, pp. 133–151. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081000687000082>.
- Tornielli, G.B., Zamboni, A., Zenoni, S., Delledonne, M. and Pezzotti, M. eds.** (2012) Transcriptomics and Metabolomics for the Analysis of Grape Berry Development. In *The Biochemistry of the Grape Berry*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, pp. 218–240. Available at: <http://www.eurekaselect.com/node/98490>.
- Usadel, B., Schlüter, U., Mølhøj, M., Gipmans, M., Verma, R., Kossmann, J., Reiter, W.-D. and Pauly, M.** (2004) Identification and characterization of a UDP- d-glucuronate 4-epimerase in Arabidopsis. *FEBS Lett.*, **569**, 327–331. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2004.06.005>.
- Vallarino, J.G., Merchante, C., Sánchez-Sevilla, J.F., et al.** (2020) Characterizing the involvement of FaMADS9 in the regulation of strawberry fruit receptacle development. *Plant Biotechnol. J.*, **18**, 929–943. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbi.13257>.
- Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., et al.** (2015) Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytol.*, **208**, 482–496.
- Veselý, J. and Čihák, A.** (1978) 5-azacytidine: Mechanism of action and biological effects in mammalian cells. *Pharmacol. Ther. Part A Chemother. Toxicol.*, **2**, 813–840.
- Villarreal, N.M., Bustamante, C.A., Civello, P.M. and Martínez, G.A.** (2010) Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 683–689. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3868>.
- Xie, M., Huang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, H., Yu, O., Dai, W. and Fang, C.** (2013) Transcriptome profiling of fruit development and maturation in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd). *BMC Genomics*, **14**, 823. Available at: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-823>.
- Xu, J., Wang, X., Cao, H., Xu, H., Xu, Q. and Deng, X.** (2017) Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus. *DNA Res.*, **24**, 509–522.
- Yun, Z., Li, T., Gao, H., Zhu, H., Gupta, V.K., Jiang, Y. and Duan, X.** (2019) Integrated Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomics Analysis Reveals Peel Ripening of Harvested Banana under Natural Condition. *Biomolecules*, **9**. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31052343>.
- Zhang, A., Wang, W., Tong, Y., Li, M., Grierson, D., Ferguson, I., Chen, K. and Yin, X.** (2018) Transcriptome Analysis Identifies a Zinc Finger Protein Regulating Starch Degradation in Kiwifruit. *Plant Physiol.*, **178**, 850–863. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.18.00427>.
- Zhang, Q., Feng, C., Li, W., Qu, Z., Zeng, M. and Xi, W.** (2019) Transcriptional regulatory networks controlling taste and aroma quality of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit during ripening. *BMC Genomics*, **20**, 45. Available at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5424-8>.

**Zhang, Z., Jiang, S., Wang, N., et al.** (2015) Identification of Differentially Expressed Genes Associated with Apple Fruit Ripening and Softening by Suppression Subtractive Hybridization X. Zhang, ed. *PLoS One*, **10**, e0146061. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0146061>.

**Zhang, Z., Kang, C., Zhang, S. and Li, X.** (2019) Transcript analyses reveal a comprehensive role of abscisic acid in modulating fruit ripening in Chinese jujube. *BMC Plant Biol.*, **19**, 189. Available at: <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-019-1802-2>.

**Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y., et al.** (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 154–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2462>.

**Zhu, Y.-C., Zhang, B., Allan, A.C., Lin-Wang, K., Zhao, Y., Wang, K., Chen, K.-S. and Xu, C.-J.** (2020) DNA demethylation is involved in the regulation of temperature-dependent anthocyanin accumulation in peach. *Plant J.*, **102**, 965–976. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.14680>.



**Additional files**

**Additional file 1:** Total RNA-seq data. Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* v4.0 Genome Database (<https://www.rosaceae.org/>)

**Data available on the electronic version of the thesis.**



## **CHAPTER 4**

### **A novel carboxylesterase is involved in volatile production in strawberry fruit**

**Martínez-Rivas FJ**, Blanco-Portales R, Caballero JL, Alseekh S, Fernie AR, Schawb W, Muñoz-Blanco J, Molina-Hidalgo FJ. 2021. A novel carboxylesterase is involved in volatile production in strawberry fruit

## Introduction

As part of a variable diet, strawberry is becoming one of the most considerable fruit in the world. Consumers appreciate it because of its unique flavor and nutritional quality. Nevertheless, a decline in strawberry sales has focused scientific studies and producers' urges in prolonging shelf life, and improving yield, (Qin *et al.*, 2008). Those studies have put aside breeding objectives in regards with flavor characteristics. Meanwhile consumer most valuable feature to buy or not this fruit is taste (Yan *et al.*, 2018). More than a 90% of consumers prefer strawberries with "intense" aroma, and this quality is even more important than the size or shape of the fruit. (Bhat *et al.*, 2015) Strawberry fruit ripening culminates as the flesh softens, volatile emission peaks, and sugars accumulate. This highly coordinated process results in fruit with strong liking due primarily to texture, flavor, and sweetness (Schwieterman *et al.*, 2014).

The strawberry unique flavor is due to sugar, acids and volatile compounds. The content and balance of those compounds would define their taste. The predominant sweet compound are sugars, in the form of glucose, fructose and sucrose. Sour metabolite major compounds are acids, especially citric and malic acid (Giampieri *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012). Although volatiles are found in a very low concentration, only 0.001-0.01% in fresh weight, little changes in their composition may change the taste dramatically (Larsen and Poll, 1990). More than 360 volatiles are found in strawberry fruits, and these compounds include esters, alcohols, ketones, furans, terpenes, aldehydes and sulfur compounds (Zabetakis and Holden, 1997). Volatiles are not only involved in taste, but also in plant defense (both herbivores and pathogens), plant-to-plant interactions and attraction to seed dispersers and pollinators (Dudareva and Pichersky, 2008; Kessler, 2001; Raguso, 2008).

In most fruits, as is the case with strawberry, the emission of volatiles begins and increase with the process of fruit ripening. Strawberry volatiles are mainly composed by esters which, depending on the cultivar, make up between 25-90% of total volatile content in strawberry (Jetti *et al.*, 2007). These esters are synthesized by alcohol acyltransferases and are broken down by carboxylesterases (D'Auria, 2006), being the relationship between the two antagonistic enzymatic activities what would determine the amount of volatile esters and alcohols. In strawberry (*Fragaria x ananassa*), Two genes coding for alcohol acyltransferases have been characterized, SAAT and AAT2, (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012), while, in wild *F. vesca*, has only been characterized the enzyme VAAT and its corresponding gene *FvAAT* (Beekwilder *et al.*, 2004) and in *F. chiloensis* (González *et al.*, 2009). Both *F. ananassa* enzymes increases their expression along the ripening process and their expression is negatively regulated by auxins. While *FaAAT2* is more active with C6-C10 alcohols and shows less activity with short-chain

alcohols, FaSAAT present a higher activity with short alcohols. Thus, esters present in the fruits depends on the availability of substrates and specificity of the AAT enzymes (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012). But, until this point, no carboxylesterase has been previously characterized in strawberry, leaving unknown the functional activities of those enzymes in strawberry fruit.

Plant carboxylesterases (CXE, EC 3.1.1.1) are hydrolytic enzymes that belong to the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily of proteins. In the presence of water, these enzymes catalyze the hydrolysis of carboxylic esters into their corresponding alcohols and carboxylic acids. Structurally, CXEs present a conserved catalytic triad, contained in the conserved sequence GX SXG, formed by serine, an acidic amino acid, and a histidine, and that constitutes the active site of these enzymes (Ileperuma *et al.*, 2007; Marshall *et al.*, 2003; Oakeshott *et al.*, 1999). In plants, the functions of CXE enzymes are poorly understood. However, it has been suggested that they could be related to important biochemical and physiological functions in plants as xenobiotics degradation, biotic stresses, as well as with the production of volatiles compound that are components of the ripen fruits aroma (Cunnac *et al.*, 2007; Souleyre *et al.*, 2011; Cao, Duan, *et al.*, 2019; Cao, Xie, *et al.*, 2019).

In *Arabidopsis thaliana*, the carboxylesterase enzymes were classified in three clades; Clade I, included those CXE related with the xenobiotic responses, scent volatiles degradation and others metabolites modification; Clade II contains salicylic acid binding protein with CXE activity as well as methyl esterases (MES), this esterases play important roles in the interactions between plants and pathogens; while Clade III includes the GDLipases those which present carboxyl esterase enzymatic activity (Marshall *et al.*, 2003; Gershter and Edwards, 2007)

Plants CXE clade 1 and 3 could, preferably, catalyze the hydrolysis of a wider range esters, for instance those composed by different acyl group combined to linear chain of fatty acids (C1-C16), branched chain, or aryl esters (Cummins *et al.*, 2007; Ileperuma *et al.*, 2007). The putative involvement of the CXEs clade 2 in the defensive plant responses against some fungal pathogens it has been proposed. The *Arabidopsis thaliana* carboxylesterase AtCXE8 is part from the plant response against the fungal pathogens *Botrytis cinera* (Lee *et al.*, 2013). The resistance observed by transgenic pepper fruits, overexpressing the gene *PepESTs*, in its interaction with the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporoides*, was, at least, partially mediated by an increase in the amount of the encoded CXE enzyme (PepEST) (Ko *et al.*, 2016)

The functional role played by CXEs throughout the fruit ripening has been poorly studied. In *Malus* it has been demonstrated that a ripening-related carboxylesterases (MdCXE1) could be

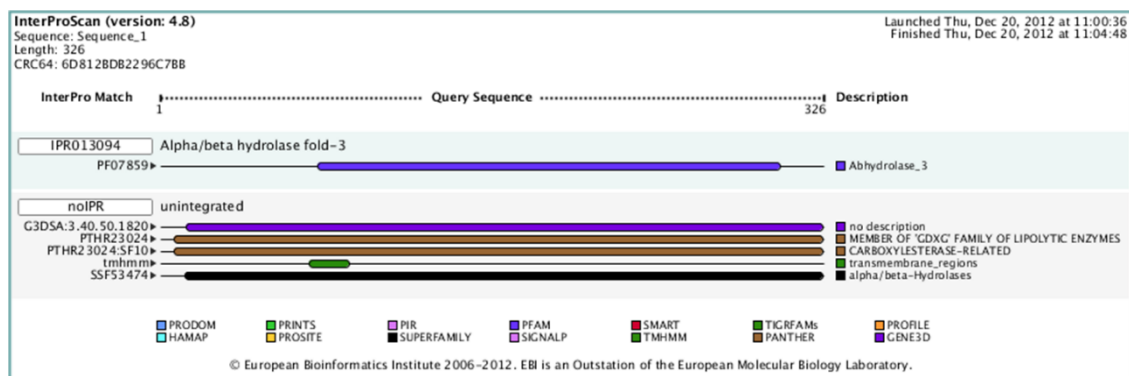
associated to flavor esters hydrolysis, mainly butyl and hexyl acetated that are components of the ripen fruit aroma (Souleyre *et al.*, 2011). In a similar way, in tomato (*Solanum lycopersicum*), SICXE1 is responsible for the regulation of the fruit volatile acetate ester content (Goulet *et al.*, 2012). Moreover, in *prunus* a CXE has been related with ester production in the ripening process, whose overexpression reduces the amount of esters produced (Cao, Xie, *et al.*, 2019)

Previous transcriptomic studies performed in our research group (Medina-Puche *et al.*, 2016) enabled us to identify a ripening-related carboxylesterase in strawberry fruit, which displayed significant sequence homology with carboxylesterases from higher plants. In this study, we report the isolation and biochemical characterization of one of them, FaCXE2 that is expressed during the strawberry fruit growth and ripening and has a specific expression pattern related to the fruit. The semi-purified recombinant enzyme has been obtained and its enzymatic affinity for different substrates studied. Our results show that FaCXE2 is an enzyme with biochemical activity, able to hydrolyze esters *in vitro*, supporting the possibility that the FaCXE2 protein could play a role in the production of volatile compounds during the ripening in strawberry fruit. Transient transgenic silenced fruits exhibit a down regulation of FaCXE2 concomitant with an increase of esters, as methyl hexanoate, methyl butanoate and ethyl hexanoate, among others as well as an increase of alcohols, hexenol and linanool, proving that FaCXE2 plays a role regulating volatile content in strawberry.

## Results

### Bioinformatics and phylogenetics analysis of the *FaCXE2* gene and protein

Previous analyses comparing transcriptomes of green immature *versus* red-ripened strawberry receptacles using a 35k microarray oligo-based platform enabled us to identify a gene encoding a carboxylesterase putative (*FaCXE2*) (Medina-Puche *et al.*, 2014). This gene was strongly up-regulated in ripened fruits. The cDNA sequence of the *FaCXE2* gene contains an open reading frame of 981bp, encodes a polypeptide of 326 amino acids and has a predicted molecular mass of 37.06 KDa. An InterPro scan revealed that this sequence had signatures resembling to proteins that belong to the family of carboxylesterases, including in the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily. InterPro scan find homology with the subgroup GDXG family of lipolytic enzymes and a transmembrane region (Fig 1). In addition, a BLASTP search showed a high degree of similarity between this *FaCXE2* and carboxylesterases from higher plants, with identities ranging from 50 % to 78 %.



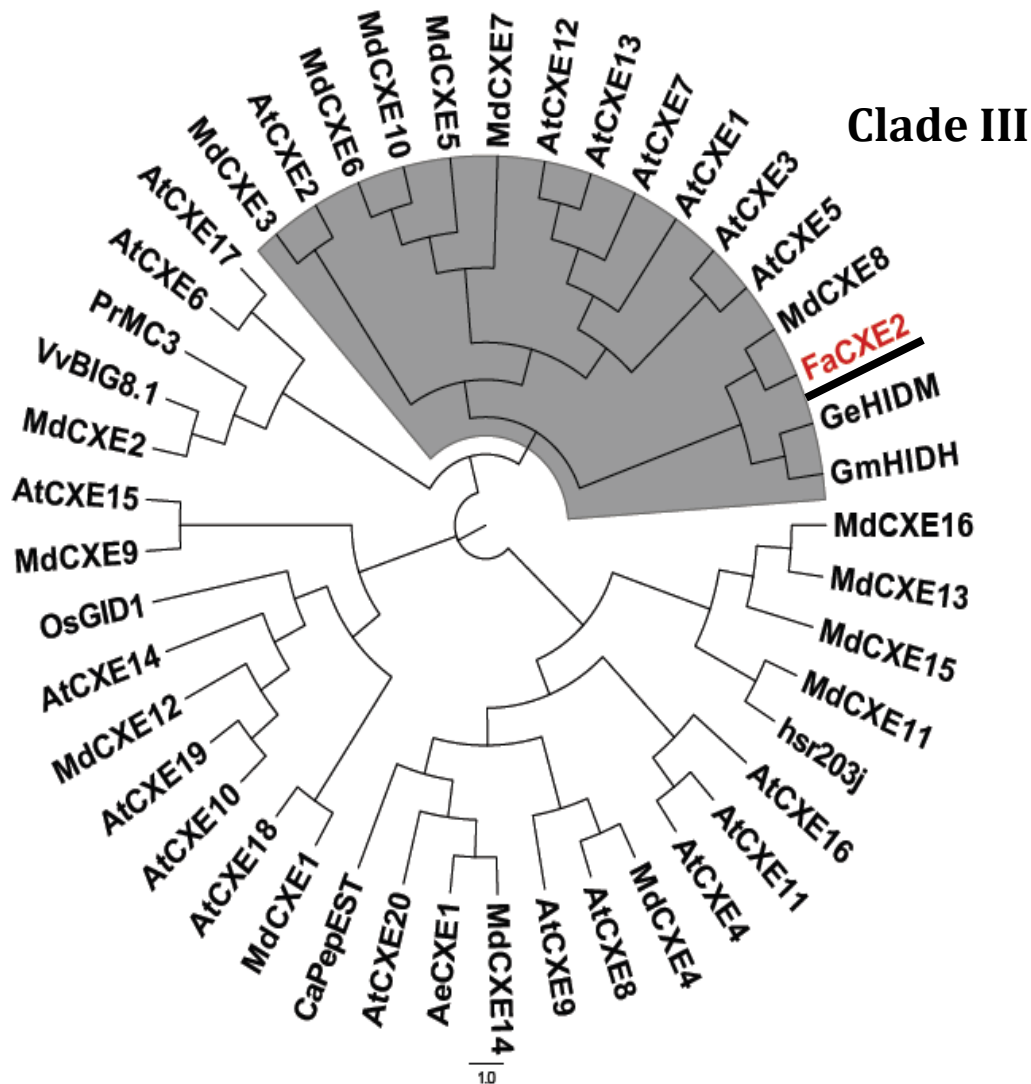
**Fig 1.** Predicted domain present in FaCXE2 aminoacidic sequence using InterProScan. An alpha/beta hydrolase domain is present in the sequence.

Phylogenetic analysis of the predicted sequence of FaCXE2, together with plant CXEs of known function, 16 apple CXEs described in (Souleyre *et al.*, 2011), and the 20 *A. thaliana* CXEs described in (Marshall *et al.*, 2003) was conducted (Fig 2). FaCXE2 is related to the dehydratases, MdCXE8, HIDM and HIDH, involved in isoflavanone biosynthesis in soybean and liquorice including in the clade III, following the classification of (Souleyre *et al.*, 2011). These proteins have similar molecular weight, similar isoelectric point and the same prediction for its subcellular localization than FaCXE2 (Table 1). The predicted catalytic triad residues (Ser, Acid, and His) including the pentapeptide sequence (GXSXG) surrounding the nucleophilic serine is present in the aminoacidic sequence (Fig 3). FaCXE2, as MdCXE8 has a serine at its active center like almost all other carboxylesterase-like proteins, rather than a threonine as the dehydratases HIDM and HIHD possess (Fig 3). A conserved sequence (Gly-82- Gly-83) constituting an oxyanion hole within the carboxylesterase motif, and a conserved carboxyl-terminal KDEL-tetrapeptide motif is present too in the protein (Sato and Hosokawa, 2006).

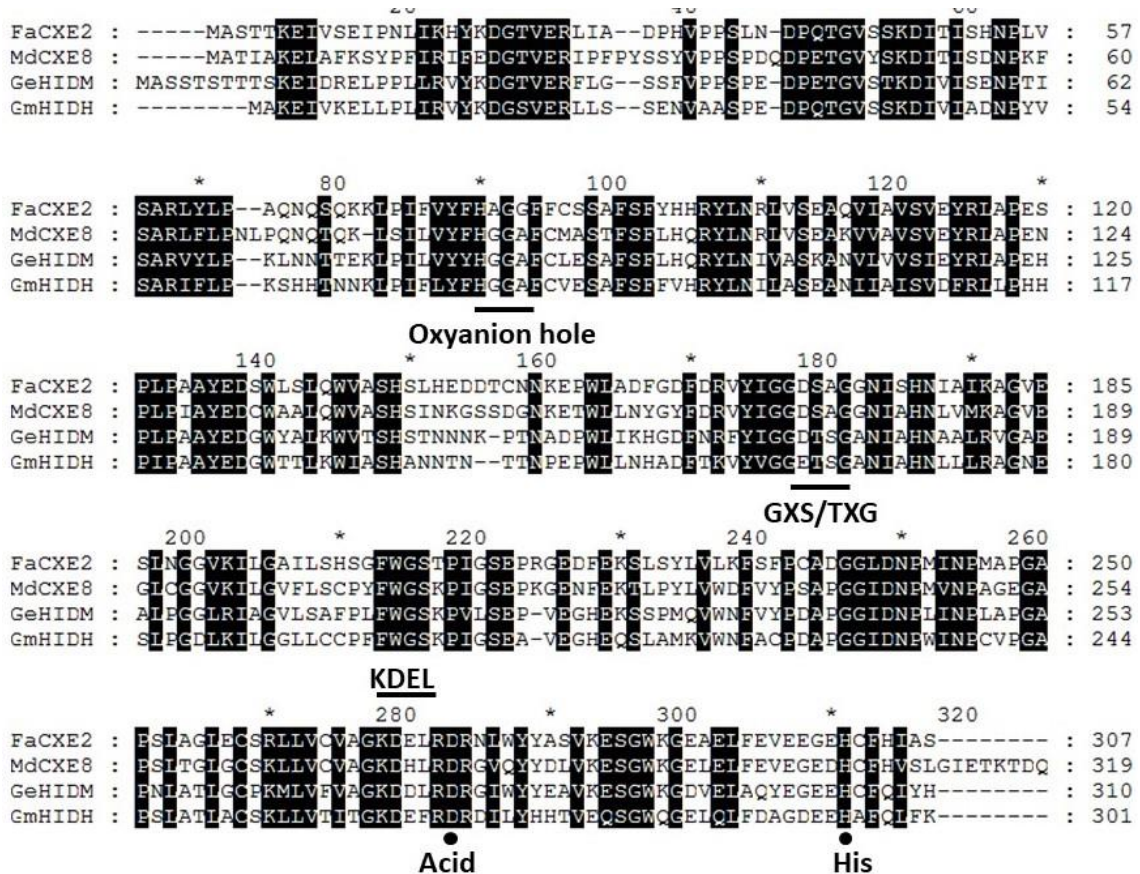
**Table 1.** Predicted properties of different carboxyl esterase characterized in plants and the prediction of the intracellular localization of the proteins using two different websites.

	FaCXE2	MdCXE8	GeHIDM	PpCXE1	GmHIDH
<b>NCBI Acc. No</b>	XP_004290227.1	ES789984	BAD80839.1	ONH91534.1	BAD80840.1
<b>Protein size (aa)</b>	325	339	328	315	319
<b>pI</b>	5.29	5.46	5.41	6.15	5.75
<b>MW (Da)</b>	35789.38	37528.71	36060.81	34469.3	35138.09
<b>Prediction of intracellular localization of the proteins</b>					
<b>Cello2Go</b>	cytoplasme	chloroplast	cytoplasme	cytoplasme	cytoplasme
<b>WolfPSORT</b>	cytoplasme	chloroplast	cytoplasme	cytoplasme	cytoplasme





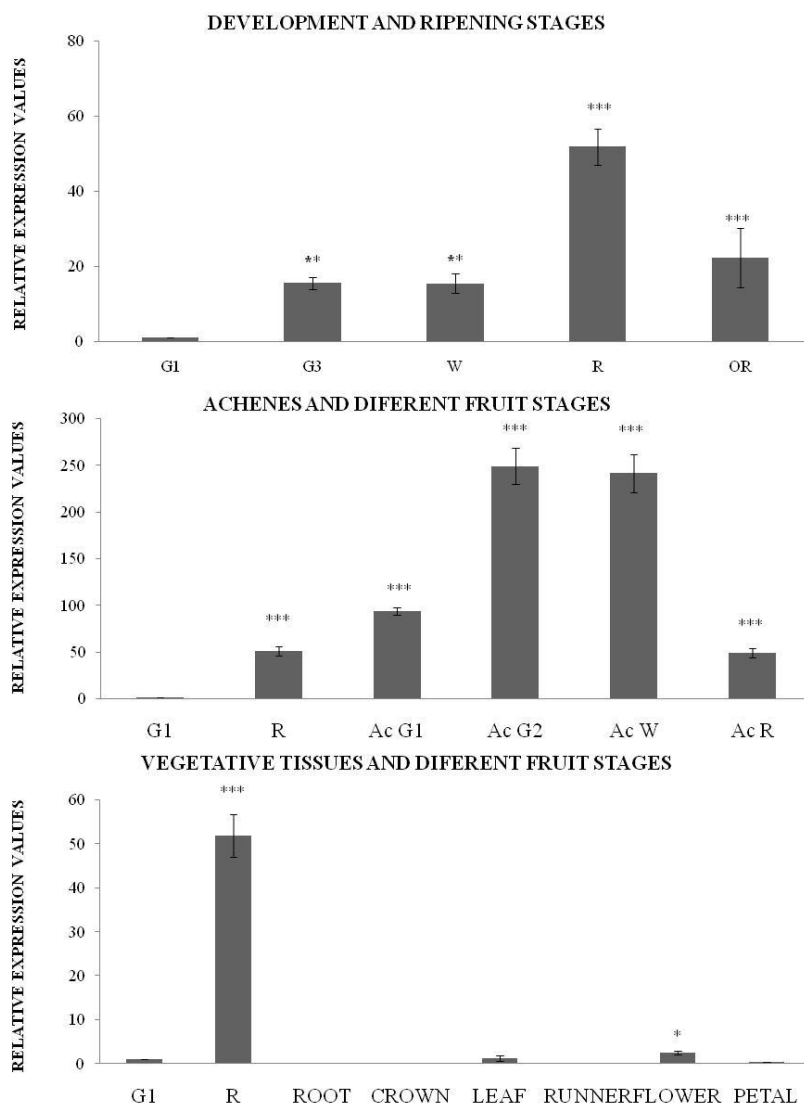
**Fig 2.** Phylogenetic tree of plant CXE family members. CXE protein sequences predicted from cDNA sequences. Abbreviations for species, carboxylesterase names, and their GenBank accessions are as follows: strawberry (*Fragaria × ananassa*; FaCXE2) apple (*Malus domestica* carboxylesterase; MdCXE1: ES789959; MdCXE2: ES789969; MdCXE3: ES789964; MdCXE4: ES789967; MdCXE5: ES789968; MdCXE6: ES789979; MdCXE7: ES789974; MdCXE8: ES789984; MdCXE9: ES789966; MdCXE10: ES789970; MdCXE11: EG631279; MdCXE12: ES790010, MdCXE13: ES789965; MdCXE14: EG631362; MdCXE15: CN942679; MdCXE16: EB106571); *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* carboxylesterase; AtCXE1: NP\_173353.1; AtCXE2: NP\_564507.1; AtCXE3: NP\_175387.1; AtCXE4: NP\_564552.1; AtCXE5: NP\_175389.1; AtCXE6: NP\_564936.1; AtCXE7: NP\_178453.1; AtCXE8: NP\_566047.1; AtCXE9: NP\_182085.1; AtCXE10: NP\_187163.1; AtCXE11: NP\_180300.1; AtCXE12: NP\_190438.1; AtCXE13: NP\_190439.1; AtCXE14: NP\_191860.1; AtCXE15: NP\_196275.1; AtCXE16: NP\_568298.1; AtCXE17: NP\_197112.1; AtCXE18: NP\_197744.1; AtCXE19: NP\_198084.1; AtCXE20: NP\_201024.1); grape (*Vitis vinifera* BIG8.1; VvBIG8.1: AF487826.1); kiwifruit (*Actinidia eriantha* carboxylesterase, AeCXE1: DQ279914); licorice (*Glycyrrhiza echinate* HIDM; GeHIDM: BAD80839.1); pepper (*Capsicum annuum* PepEST; CaPepEST, AAF77578.1); pine (*Pinus radiata* PrMC3; PrMC3: AAD04946.2); soybean (*Glycine max* HIDH; GmHIDH: BAD80840.1); tobacco (*Nicotiana tabacum* hsr203j; hsr203j, AAF62404.1); rice (*Oryza sativa* GID1: AAV59435.1).



**Fig 3.** Alignment of the amino acid sequence of FaCXE2, MdCXE8, GeHIDM and GmHIDH. Putative residues that constitute the catalytic triad (Ser/Thr, Asp, and His) are indicated with a point (●), the GXS/TXG sequence, the oxyanion hole (Gly- Gly) and the KDEL-motif are underlined.

**Spatio-temporal expression profile of *FaCXE2* gene**

In fruit receptacles, the amount of *FaCXE2* transcript was found 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 stage (OR, SN) (Fig 4). *FaCXE2* gene was strongly expressed in the fruit achenes. In addition, *FaCXE2* is a fruit related gene as minimal expression has been found on all vegetative tissues studied. In all such tissues, *FaCXE2* expression was very low and similar to that observed in receptacles at the G1-stage (Fig 4).

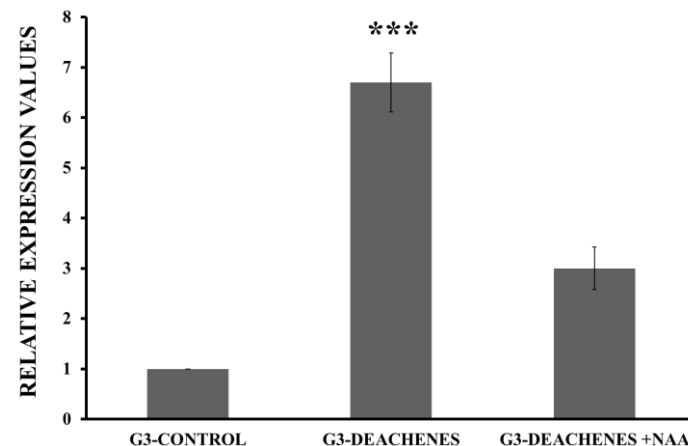


**Fig 4.** Developmental expression of the strawberry *FaCXE2* in fruit receptacle (A), achenes (B) and vegetative tissues (C) of *F. × ananassa* cv. Camarosa. QRT-PCR results were obtained using specific primers for *FaCXE2* gene. Quantification is based on Ct values, as described in Materials and Methods. 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; SN: senescent stage; Ac G1: achenes in G1 stage; Ac G3: achenes in G3 stage; Ac W: achenes in W stage; Ac R: achenes in R stage. Statistical significance with respect to the reference sample was determined by the Student's t-test. (\*)  $p$ -value < 0.1 (\*\*)  $p$ -value < 0.01 and (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001.

#### ***FaCXE2* gene expression is hormonally regulated by auxins and ABA**

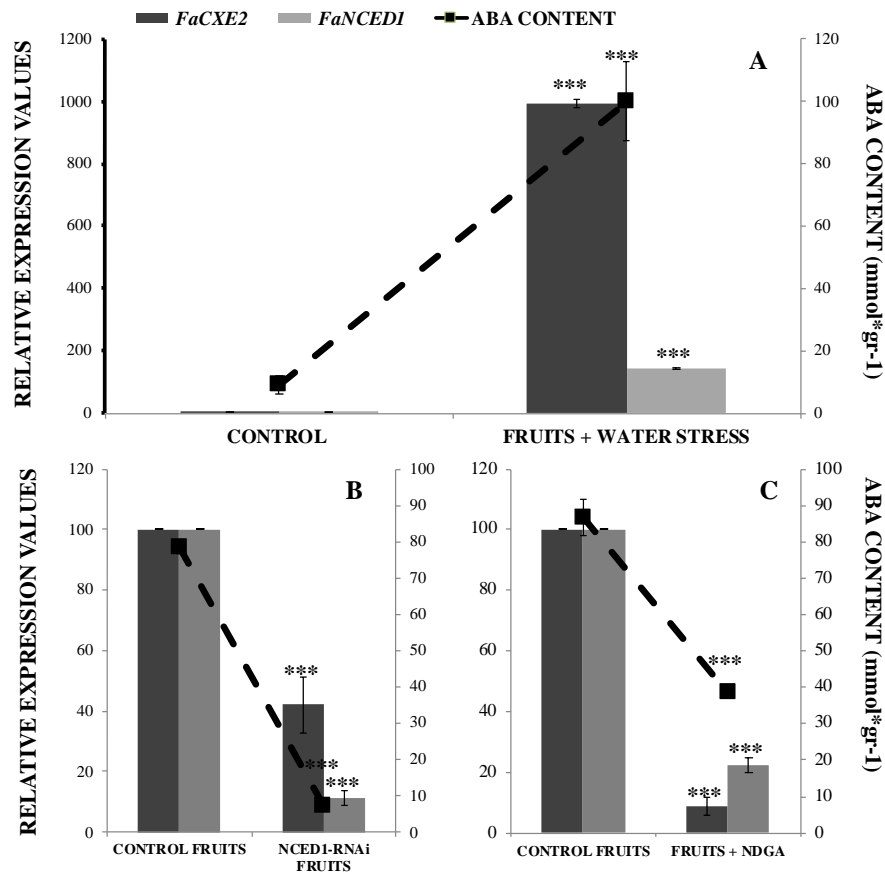
It has been proposed that the ABA/auxin ratio in receptacles could be a signal that triggers the strawberry fruit ripening process (Perkins-Veazie, 1995). Auxins are mainly produced by the achenes and released afterwards to the receptacles, fostering receptacle to growth and development while preventing premature ripening. To analyze the *in vivo* effects of auxins, 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 the auxin NAA. A clear increase in

*FaCXE2* amount transcripts was detected in de-achened G3-fruits (Fig 5). However, this increase in gene expression was prevented when the deachened fruits were treated with a lanonin paste containing NAA. These results clearly indicated that the expression of this gene is negatively regulated by auxins.



**Fig. 5.** Analysis of the effects of removing achenes from G3 developing fruits and their treatment with auxins on *FaCXE2* 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: middle-sized green fruit receptacle; G3-Achenes: G3 fruit receptacle without achenes for 5 days; G3-Achenes+NAA: G3 fruit receptacle without achenes plus NAA 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 < 0.01 (\*\*\*)  $p$ -value < 0.001.

To assess the role played by ABA in the regulation of *FaCXE2* expression, this work modulated ABA content (up and down) through three experimental approaches: i) depleting plants of water, as water stress is known to increase ABA content in the plants (Fig. 6A); ii) transiently silencing the expression of *FaNCED1* coding 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, the key enzyme responsible for ABA biosynthesis (Fig. 6B); and iii) adding NDGA, a well-known inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase activity (Fig. 6C). All of these experiments were accompanied by the measurement of ABA content in fruit receptacles and the *FaNCED1* gene relative expression as marker of the biosynthesis of ABA. An early appearance as well as a substantial increase of fruit red colouration appear in fruits subjected to water stress. In contrast, a lack of red colouration was observed in fruits that were either agroinfiltrated with *FaNCED1*-RNAi constructs or treated with the inhibitor NDGA. Substantial changes in ABA content (either increase or decrease) in receptacles occurred under the three different experimental procedures described above. In all of these cases, *FaCXE2* expression always correlated with that of ABA content and the expression of *FaNCED1* was always parallel. These results strongly suggest that ABA presence in the receptacles can positively regulate the expression of *FaCXE2*.



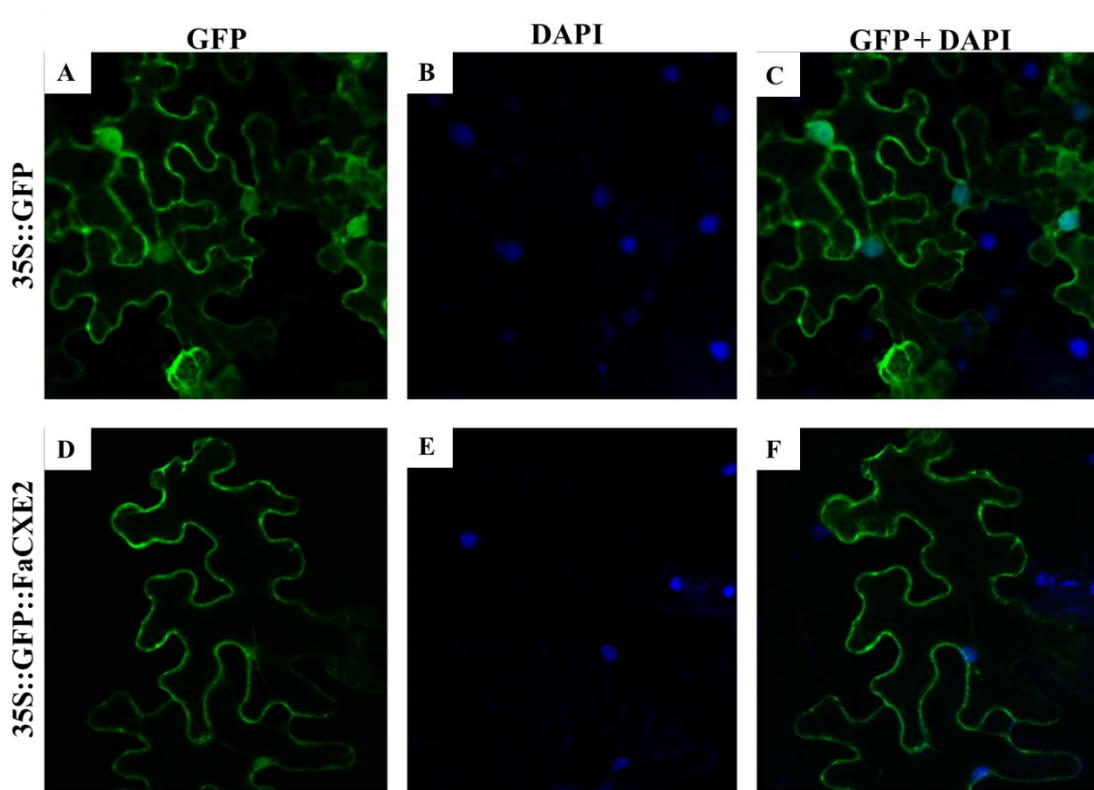
**Fig. 6.** Analysis by qRT-PCR of *FaCXE2* and *FaNCED1* gene expression in (A) strawberry G-W fruits under water stress. (B) strawberry G-W fruits agroinfiltrated with the NCED1-RNAi construct and (C) G-W fruits treated with NDGA. In each experimental situation, the dashed line indicates the ABA content in the fruits analyzed. (A) Control fruit: fruits with their pedicels immersed in MS medium with sucrose. *FaCXE2* and *FaNCED1* gene expression was analyzed in fruits with their pedicels kept in the air. Both samples were harvested 4 days after the beginning of treatment. (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 H<sub>2</sub>O; Fruit + NDGA: G-W fruits injected with NDGA (100  $\mu$ M); both samples were harvested 8 days after the beginning of treatment. The cultivar used in both experiments was *Fragaria*  $\times$  *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.

Taken together, these results indicate that, as in the case of other strawberry ripening-related genes, the expression of *FaCXE2* gene is clearly regulated by both ABA and auxin content of the fruit receptacle, supporting the proposal of (Perkins-Veazie, 1995) and the findings described by (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014)

### Subcellular location of FaCXE2 protein

One of the main applications of the transient gene assay tools is to monitor the localization of proteins to subcellular compartments in living cells. To determine the subcellular localization pattern, amino acid sequence analysis of FaCXE2 protein suggested one putative transmembrane region located. Moreover, the common carboxyl-terminal sequence KDEL, is an essential structural motif for retention of the protein in the luminal site of endoplasmic reticulum through

the KDEL receptor bound to the endoplasmic reticulum membrane (Sato and Hosokawa, 2006). To verify that FaCXE2 protein is anchored to a membrane in plant cells, we constructed a translational fusion between FaCXE2 and GFP. The fusion protein was expressed under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. *Agrobacterium tumefaciens* carrying either 35S::GFP::FaCXE2 or the control construct 35S::GFP were transiently expressed into leaf cells of *Nicotiana benthamiana* by infiltration. For this analysis, leaves were transformed and after 4 days were stained with DAPI, after which patterns of GFP fluorescence were determined. The control GFP pK7WGF2 empty vector was localized in the nucleus, cytoplasm and plasma membrane of the cells, while GFP::FaCXE2 fusion protein was targeted to the membranes only (Fig. 7). These results indicate that FaCXE2 protein works linked to a membrane cell.



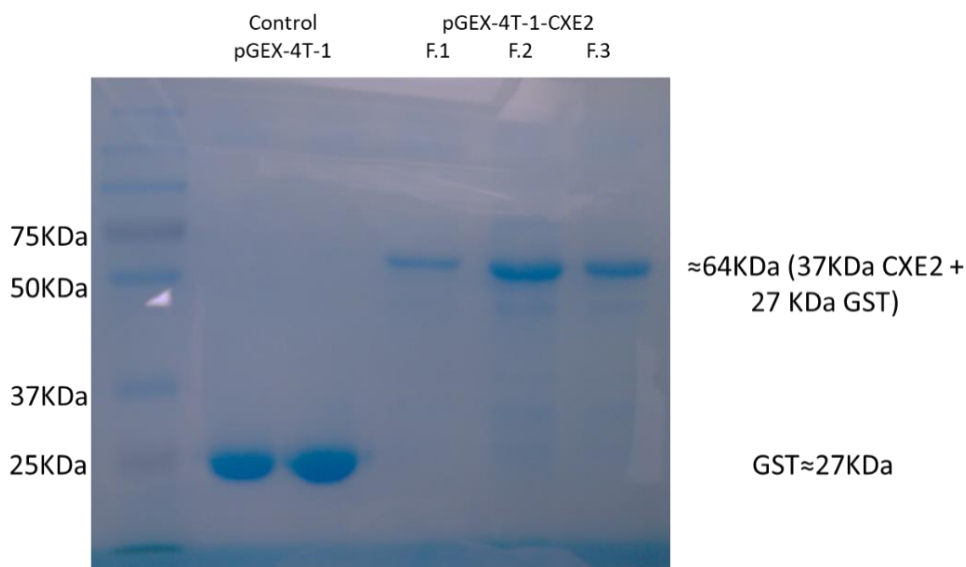
**Fig. 7.** Subcellular localization of FaCXE2 protein. Leaves of *Nicotiana benthamiana* leaves were agroinfiltrated with translational constructs 35S::GFP and 35S::GFP::FaCXE2. A-C leaves agroinfiltrated with 35S::GFP as control. D-F leaves agroinfiltrated with 35S::GFP::FaCXE2. GFP: green fluorescent protein; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (nuclei dye); MERGE: merged view of the GFP and DAPI images.

#### Enzymic characterization of the FaCXE2 protein expressed in *E. coli*

The coding region of the FaCXE2 cDNA cloned in frame with GST-tag was used to express the recombinant FaCXE2 enzyme in *E. coli*. Protein SDS-PAGE analysis showed a band that could not be detected in the control samples and presumably corresponded to the semi-purified recombinant FaCXE2-GST protein (Fig 8). The molecular mass of the FaCXE-GST



protein was 64 kDa (37 kDa plus 27 kDa of the GST-tag) which is coincident with the estimated size deduced from the full length cDNA corresponding to FaCXE2. To characterize the enzymic activity of FaCXE2 recombinant protein, the FaCXE2-GST fusion protein was semipurified from an induced crude *E. coli* extract using GST-tag resin. The kinetic properties of FaCXE2 were determined using 1-naphthyl acetate, 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate as artificial substrate of the protein in vitro. we have determined the biochemical activity of the FaCXE2 protein, these results, based on sequence similarity and comparisons alone, suggest that this gene codes for a protein with a carboxylesterase activity, involved in the strawberry fruit ripening.

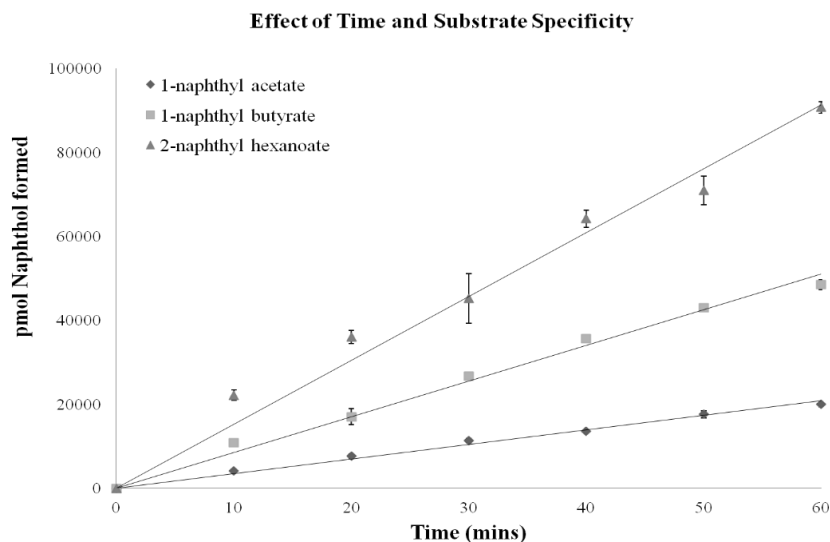


**Fig. 8** Overexpression of FaCXE2-GST in *E. coli* transformed with the pGEX-4T-1-CXE2 vector. Total protein was extracted from an overnight *E. coli* culture induced with 1mM of IPTG at 16 °C. Recombinant protein presents a MW of 64KDa.

### Catalytic Properties

#### Effect of Time, Enzyme Concentration and Substrate Specificity

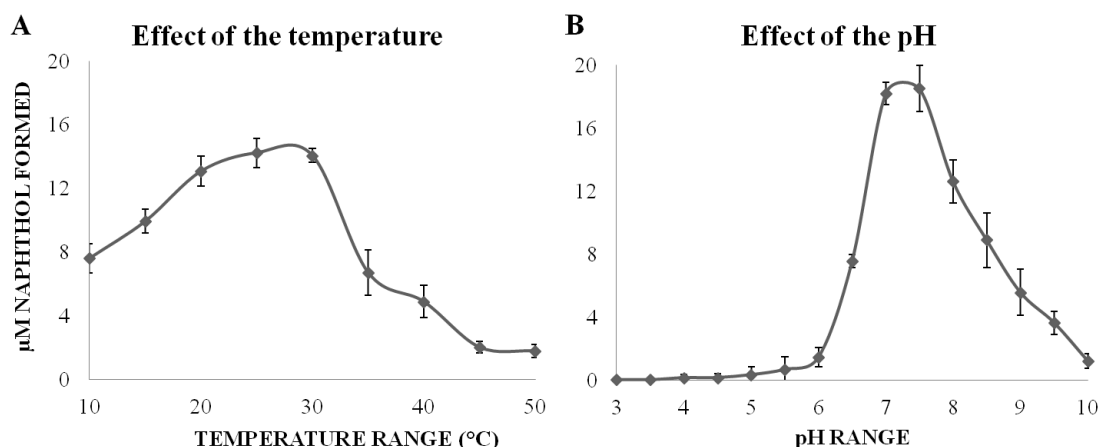
The velocity of the enzyme catalyzed reaction with time was analyzed and the activity was linear up to 60 min for FaCXE2. The effect of enzyme concentration on the hydrolysis of 1-naphthyl acetate by semi-purified FaCXE2 was analyzed and the linearity was obtained up to 125 µg of protein. The enzyme, FaCXE2 hydrolyzed 1-naphthyl and 2-naphthyl esters. FaCXE2 exhibited specific activities of 300, 900, and 1500 pmol/min protein for 1-naphthyl acetate, 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate, respectively. The enzyme showed more activity towards 2-naphthyl hexanoate (Fig. 9).



**Fig 9.** Effect of time and substrate specificity of strawberry recombinant protein, FaCXE2. 0.3 mM substrate solution, 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, 27 °C of temperature. Controls were prepared using GST protein to determine the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. 1-naphthol formed was determined colorimetrically. Error bars represent the standard error of the mean calculated from a minimum of three replicates over three experiments

### Influence of pH and Temperature on the Activity of Purified Esterase

To assess the optime pH and temperature for the FaCXE2 enzyme, we tested several conditions. We found that an optimum pH between 7 to 7.5 was observed for FaCXE2 protein (Fig 10A). Meanwhile a ranging temperature between 25 to 30°C was the optimal for this enzyme. These two characteristics are the physiological condition of a strawberry fruit. (Fig. 10B).



**Fig 10.** Temperature and pH activity profiles for strawberry FaCXE2. (A) Activity of strawberry recombinant protein, FaCXE2, at different temperatures, 0.3 mM substrate solution, 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. (B) Activity of strawberry recombinant protein, FaCXE2, at different pH, 0.3 mM substrate solution, 27 °C of temperature. Controls were prepared using GST protein to determine the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. 1-naphthol formed was determined colorimetrically. Error bars represent the standard error of the mean calculated from a minimum of three replicates over three experiments.



## Km and Vmax

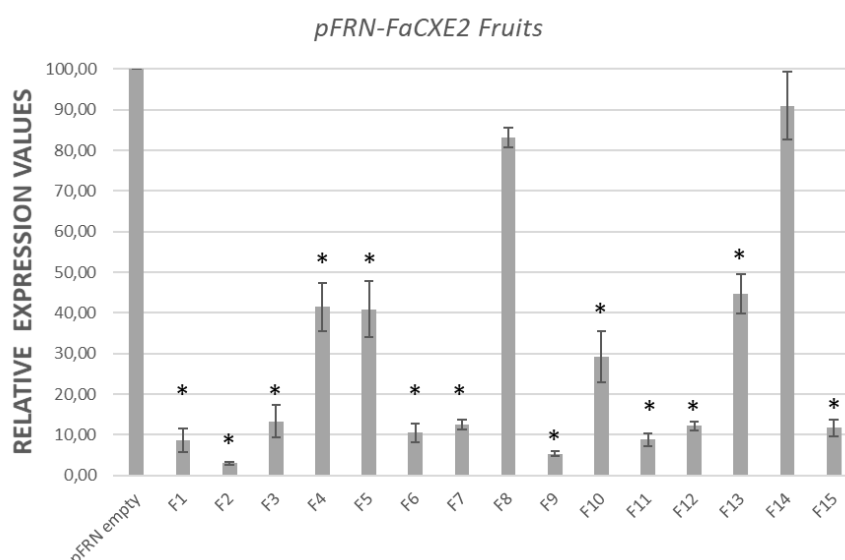
The Km and Vmax values were determined using the program Graphpad Prism 6. The Km of FaCXE2 for 1-naphthyl acetate, 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate were 0.68, 1.58, and 0.57  $\mu\text{M}$  respectively. The Vmax of FaCXE2 were 14.43, 59.44 and 130.0 pmol/min/ $\mu\text{g}$  respectively (Table 2).

**Table 2.** Kinetic parameters of semi-purified recombinant FaCXE2 for different naphthil ester hydrolysis. Standard errors represent the standard error of the mean calculated from a minimum of three replicates.

	Km (mM)	Vmax (pmol/min/ $\mu\text{g}$ )	Vmax/Km
1-naphthyl acetate	0,6784 $\pm$ 017	14,43 $\pm$ 0,55	21,14
1-naphthyl butyrate	1,579 $\pm$ 019	59,44 $\pm$ 1,37	37,64
2-naphthyl hexanoate	0,572 $\pm$ 0,25	130 $\pm$ 8,06	227,27

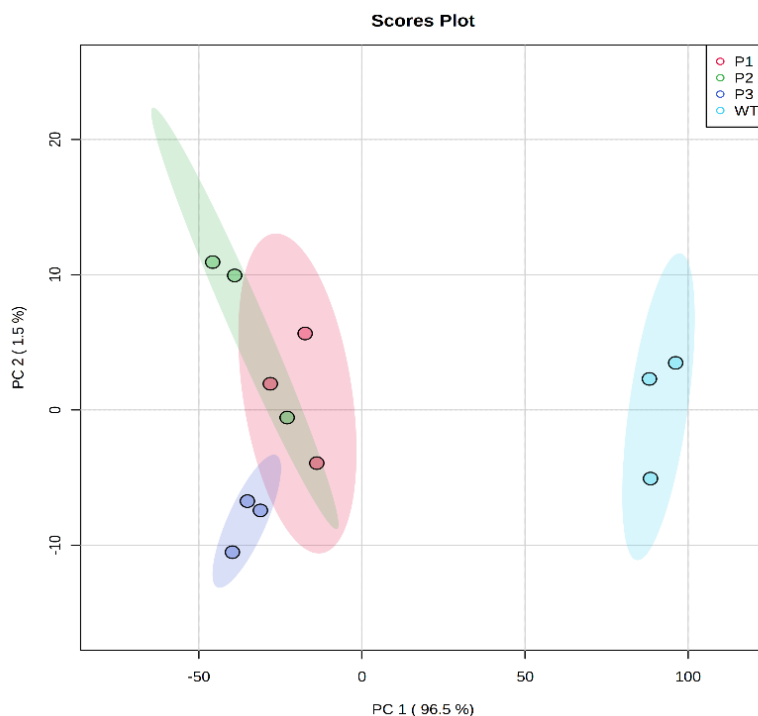
## Transient silencing of FaCXE2 alters volatile content

The expression of *FaCXE2* was transiently downregulated by agroinfiltration in fruits by RNAi, using the construction pFRN-FaCXE2. Control fruits were agroinfiltrated with the pFRN empty vector. The degree of *FaCXE2* expression was analyzed in the transgenic fruits versus the control (Fig 10). For comparative analysis, three pools of silenced fruits (three fruits per pool) and one pool of control fruits were used.



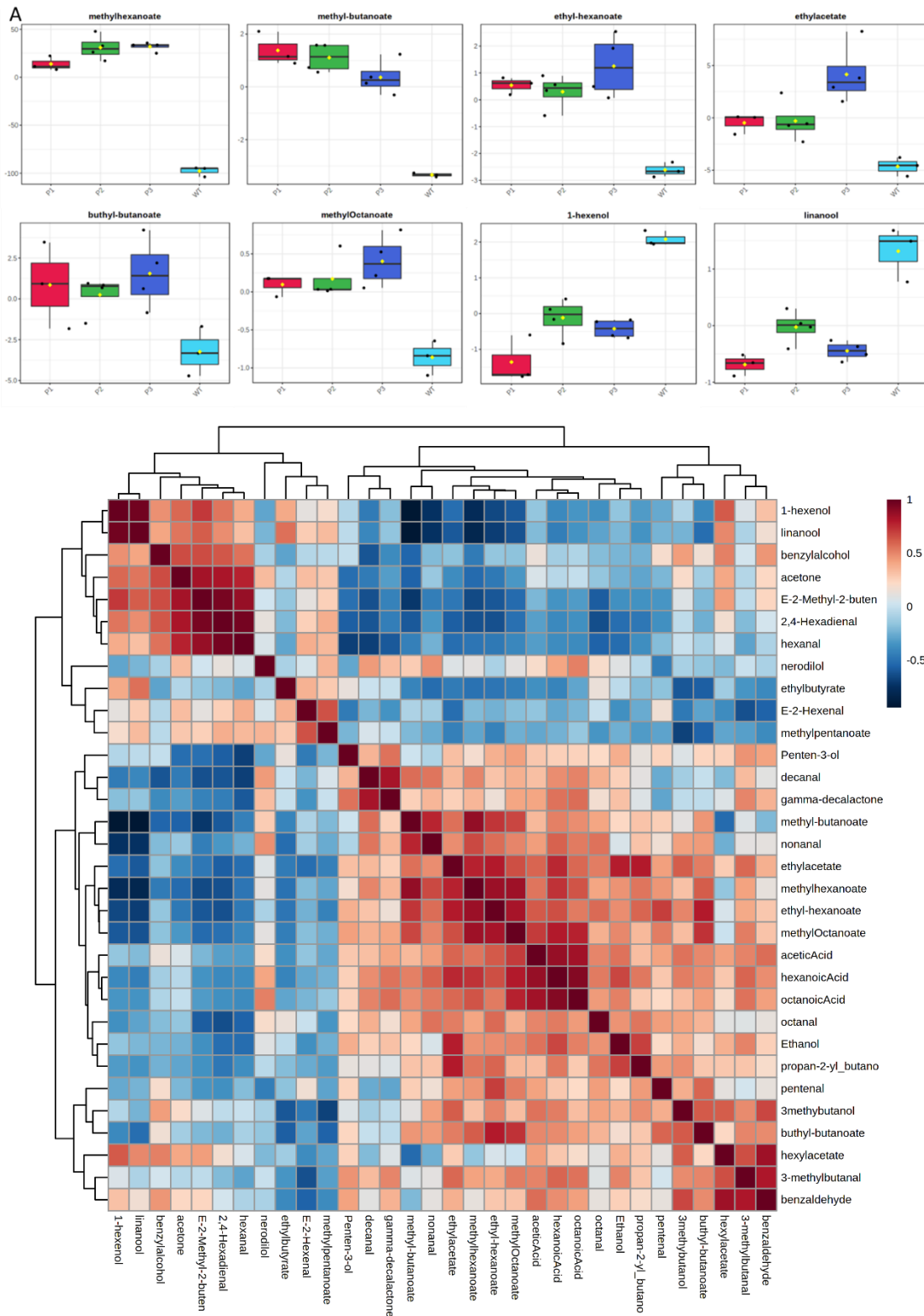
**Fig 10.** Analysis by qRT-PCR of *FaCXE2* gene expression in transgenic *FaCXE2*-RNAi strawberry fruits (*F. × ananassa* cv. Elsanta) agroinfiltrated with the empty pFRN vector (control) and pFRN-*FaCXE2* construct. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's t-test in all experiments. (\*) p-value < 0.01.

Knock-down of FaCXE2 in strawberry fruits was used to further validate the *in-vivo* function of this enzyme. After transient silencing, volatile content was determined in the agroinfiltrated fruits. A principal component analysis (PCA) shows a clear difference between the controls and the silenced fruits (Fig 12), showing a clear implication of FaCXE2 in the volatile production in strawberry fruits.



**Fig 12.** Principal component analysis of metabolites identified in receptacles of control (cyan dots) vs transgenics lines (green, blue, and red dots). Three replicates were used in metabolomic analysis for each condition

The analysis of individual esters identified that, in transgenic fruits, the concentration of different esters as methyl and ethyl hexanoate, ethyl acetate, butyl butanoate, methyl octanoate and methyl butanoate were significantly less concentrated rather than in control fruits. Furthermore, the concentration of compound containing alcohol groups, as linanool and 3-hexanol were less concentrated in the transgenics fruits than in the control (Fig 13). Other key compounds of strawberry volatilome, as  $\gamma$ -decalactone, ethanol and hexanoic acid, among did not present significative changes between the transgenic fruits and control ones. As seen on Fig 13, the content of esters is inversely correlated with those of alcohol containing groups as nerodilool, linanool and benzylalcohol.



**Fig 13.** A) Relative concentration of diverse esters and alcohol compounds in transgenics (P1, P2, P3) and control (WT) receptacles. B) Correlation of volatile compounds identified in transgenics versus control receptacles.

## Discussion

Carboxylesterases (CXE) comprise a large family of hydrolytic enzymes in plants that are members of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold superfamily of proteins (Marshall *et al.*, 2003). In strawberry, our comparative transcriptomic analysis between immature (green) and ripen (red) revealed several genes encoding putatively carboxylesterases whose expression was strongly up-regulated in ripen fruits, suggesting the possibility that these genes may play an important role in strawberry in fruit softening and ripening (Medina-Puche *et al.*, 2016). Volatile esters are key compounds that not only determine consumer preferences but are also associated with enhanced defense against biotic stresses (Ko *et al.*, 2016).

Bioinformatics analyses have shown that the deduced protein of the *FaCXE2* gene contains well-conserved functional domains, such as  $\alpha/\beta$  hydrolase fold domain and a GDXG lipolytic domain. This sequence also presents a putative conserved transmembrane region. These data provided us with evidence that the protein coded by the *FaCXE2* gene may has carboxylesterase activity, that it works linked to the membrane of the cells and that it might be located in the fruit receptacle cell wall. The enzymatic activity assays have been performed in order to assign a carboxylesterase role to this protein.

The phylogenetic relationships among plant carboxylesterases are essentially in agreement with the reported classification (Marshall *et al.*, 2003), which identified up to eight clades. HIDs are located in a small group of proteins from leguminous plants in clade III. *FaCXE2* is included in this same clade. HIDM and HIDH display different substrate specificities to 2-hydroxyisoflavanones. The substrate preferences reflect the structures of isoflavonoids contained in each plant species. The spontaneous dehydration of the substrates was slow compared to the enzyme-catalyzed reaction, suggesting that dehydration of 2-hydroxyisoflavanones to form isoflavones in plant cells is primarily enzyme dependent (Akashi *et al.*, 2005).

Two HIDH enzymes from legumes, *Glycine max* and *Glycyrrhiza echinate*, have been identified and cloned, sharing 30% to 40% amino acid identity with some *AtCXES* (Akashi *et al.*, 2005) As well as classical carboxylesterase activity, as these enzymes are able to hydrolyzes pNP butyrate, HIDH and HIDM possess 2-hydroxyisoflavanone dehydratase activities, which converts 2-hydroxyisoflavanones to isoflavones (Akashi *et al.*, 2005). HIDM has high specificity towards 2,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone to produce formononetin, while HIDH has high specific activity towards 2,5,7,4'-tetrahydroxyisoflavanone to produce genistein. Isoflavonoids in plants have roles associated with environmental adaptation, including acting as plant defense compounds. Interestingly, the catalytic triad nucleophile for the HIDs is a threonine rather than

the serine identified in all other members of the plant CXE carboxylesterase family (Akashi *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2003). Even though FaCXE is located in the clade III with HIDH enzymes, it presents a serine in the catalytic triad, instead of the threonine presented by HIDH. This difference confers the ability to bind acids instead.

### ***FaCXE2* is a receptacle specific gene and hormones regulate its expression**

The *FaCXE2* gene displayed an expression pattern clearly related to ripening. This gene was predominantly expressed in fruit receptacle and achenes, and it was weakly or not expressed in any of the analyzed vegetative tissues. This expression pattern is coincident with those reported previously for other strawberry ripening-related genes, many of them related with the organoleptic properties of the strawberry fruit (Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2017; Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015; Raab *et al.*, 2006; Blanco-Portales *et al.*, 2004).

As a non-climateric fruit, strawberry ripening process did not overcome with a peak of ethylene production. Instead, it has been purposed that the ratio ABA/Auxins is the responsible to trigger this process. (Perkins-Veazie, 1995; Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2016). From one side, 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 trigger the ripening process (Perkins-Veazie, 1995). Several studies have shown that the expression of many ripening related strawberry genes (Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2017; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015) were prematurely induced upon removal of the achenes. *FaCXE2* was also prematurely induced in receptacles when achenes were removed in early stages of fruit development. However, this induction was reverted when auxin NAA was applied to these de-achened fruits, which indicates that this gene was also regulated by auxins (Fig 5).

On the other side, ABA levels gradually increase concurrently with the ripening process in strawberry fruit (Chai *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2011). To determine the role of ABA on *FaCXE2* expression, we carried out three experiment that modulate ABA quantity on fruits. Two of them are directly related with its biosynthetic pathway, either inhibiting NCED activity or silencing it by RNAi. (Creelman *et al.*, 1992) Both experiments result in a decrease of ABA levels, as well as *FaNCED1* and *FaCXE2* expression levels (Fig 6). Water stress experiment produces an increase in ABA levels and on *FaNCED1* and *FaCXE2*. Taken together, these results indicate a clear impact of hormone levels on *FaCXE2* expression, which is negatively regulated

by auxins and positivity regulated by ABA. This expression patterns are the same as presented by other genes related to organoleptic properties of strawberry (Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Aharoni *et al.*, 2000; Medina-Puche *et al.*, 2015; Molina-Hidalgo *et al.*, 2017).

### **Subcellular localization**

Our experiments aimed to determine the subcellular localization of FaCXE2 were made with GFP fusion protein. FaCXE2 was targeted in the cellular membrane or cell wall. This is coherent with the predicted localization obtained in different predictor servers, and with the presence of the KDEL motif in the sequence, that indicates is possible situation in a membrane cell. It is described that *Prunus* PpCXE1 is also localized at the cytosol (Cao, Xie, *et al.*, 2019). This localization is similar to that of other Alcohol acyltransferases, suggesting that this colocalization of biosynthetic and hydrolytic enzymes might create a cycle between esters and alcohols modulating the volatile composition (Bontpart *et al.*, 2015; Goulet *et al.*, 2015).

Previously, Flavonol synthase 1, chalcone synthase and chalcone isomerase were localized in *Arabidopsis* nuclei. A flavonoid- 3'-hydroxylase was localized in the tonoplast in the hilum region of the soybean immature seed coat (Falcone Ferreyra *et al.*, 2012). In grape, PAL was primarily present in the cell walls, secondarily thickened walls, and the parenchyma cells of berry mesocarp cells, while C4H was distributed in the chloroplast (plastid) and nucleus and 4CL mainly in the secondarily thickened walls and parenchyma cells of the mesocarp vascular tissue, suggesting that the distributions of PAL, C4H, and 4CL were compartmental (Chen *et al.*, 2006). However, because little was known about the subcellular localization and the relationship with the molecular mechanisms of these enzymes and their action in fruits. It is still difficult to propose the physiological significance of the subcellular distribution.

### **Recombinant FaCXE2**

The production of recombinant FaCXE2 in bacteria and its semi-purification has allowed the characterization of its carboxylesterase activity. The optimal pH for its activity was 7.5. Carboxylesterases from other organisms generally show a pH optimum between pH 7.0 and 9.0 (Kim and Lee, 2004; Souleyre *et al.*, 2011; Cao, Xie, *et al.*, 2019) This neutral to basic optimal pH range is consistent with the hydrolytic mechanism for carboxylesterases, where the catalytic triad requires a deprotonated histidine (pKa = 6.0) to activate the active site serine (Matthews *et al.*, 2013). On the other hand, FaCXE2 present an optimal temperature between 25-30°C, which is consistent with the physiological temperature of strawberry crops. FaCXE2 showed most affinity towards the longer chain naphthyl esters and among these, the preferred substrate was 2-naphthyl hexanoate. This activity may be important for the hydrolysis of chain fatty acid esters

during ripening. Those catalytic properties are similar to the ones present by others carboxylesterases on apple (Souleyre *et al.*, 2011) and peach (Cao, Xie, *et al.*, 2019).

### **FaCXE2 has a role on volatile production in strawberry**

We have investigated a role for CXEs of strawberry in the hydrolysis of esters that make up an important component of the flavour volatiles produced by ripening strawberry fruit. Two of the CXEs from strawberry were identified previously as expressed in strawberry fruit, with increasing gene expression during the ripening. Both FaCXE1 and FaCXE2 are expressed in strawberry fruit, but only FaCXE2 shows an expression profile similar to ripening-related genes and is controlled by ABA and auxin.

Recently, two fruit related carboxylesterases are been characterized. *Malus* MdCXE1 and *Prunus* PpCXE1. Both are ripening-related and their expression patterns are modulated by the action of hormones, presenting a similar pattern as strawberry FaCXE2 (Cao, Xie, *et al.*, 2019; Souleyre *et al.*, 2011). Overexpression of *PpCXE1* both transiently in peach and stable in tomato decreased the content of volatile esters, indicating that is a regulator of volatile content (Cao, Xie, *et al.*, 2019). The *in-vitro* activity of the recombinant FaCXE2 protein suggest that it could play a role in volatile production during ripening process. Transient downregulation of strawberry FaCXE2 shows clear differences in the volatile content between the transgenics receptacles and the controls. A higher accumulation of esters compounds in transgenics fruits, were found, and alcohol compounds were less concentrated, revealing that FaCXE2 plays a vital role in their degradation. Moreover, other volatile compounds did not present any differences, showing that FaCXE2 activity is very specific and restricted to some esters.

The *in vitro* activity of FaCXE2 in hydrolyzing esters, together with the increase of esters *in vivo* caused by the knock-down of *FaCXE2*, indicates that this CXE is a regulator of volatile ester content in strawberry. FaCXE2 would contribute to the production of these increased alcohols through the hydrolysis of increasingly abundant esters during ripening. This hypothesis remains to be tested directly through the use of natural substrates of strawberry that could be the potential target of this enzyme.

### **Conclusions**

The carboxylesterases represent a large, diverse and complex group of enzyme molecules with overlapping substrate specificities and very little is known about their natural substrates. Strawberry fruit express at least two members of the CXE family (*FaCXE1* and *FaCXE2*). The expression of *FaCXE2* increases substantially upon fruit ripening and it is hormonally regulated

positively by ABA and negatively by auxins. Furthermore, the FaCXE2 enzyme is able to hydrolyse artificial ester substrates that are similar to those produced by ripe strawberry fruit. Together these results suggest that FaCXE2 has a role in ester metabolism in ripe fruit, modifying the ester profile produced by strawberries.

## Materials and methods

### Plant material

Strawberry plants (*F. × ananassa* Duch. cv. Camarosa, an octoploid cultivar) were grown under field conditions at Huelva, SW Spain. Different developmental and ripening stages were harvested: small-sized green fruit (green 1; 2-3 g), full-sized green fruit (green 3; 4-7 g), white fruit (5-8 g), full-ripe red fruit (6-10 g) and overripe fruit (6-10 g). Overripe fruits were softer and dark redder than red ones. Vegetative tissues, such as expanding leaves, crowns, roots, runners, flowers and petals were also harvested. All analysed tissues were immediately frozen in liquid nitrogen after harvesting and stored at -80 °C until use. *Nicotiana benthamiana* and *F. × ananassa* plants used for agroinfiltration were grown in a plant chamber at 25 °C, 10000 lux, 80 % humidity and with a photoperiod of 16 hours light and 8 hours dark.

### Hormone related experiments

For auxins related experiment, two sets of 50 full-sized green fruits (Green 3) each were used, still attached to the plant. Achenes were carefully removed from their receptacles, in accordance with (Medina-Puche *et al.*, 2014). One set was treated with indole-3-acetic acid (IAA) in lanolin paste (1 mL) containing 1 mM of auxin IAA in 1 % (w/v) dimethyl sulphoxide. The other set, the control group, was treated with the same paste, but without IAA. The auxin treatment, collection and analysis of samples were performed following the instructions by (Medina-Puche *et al.*, 2014)

On the other hand, ABA related experiment were performed both up and downregulating its concentration. To downregulate ABA levels, two approximations were used, in the first one, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) treatment was applied, as is an ideal inhibitor of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED1) enzyme, which is a crucial step on ABA biosynthesis, and was used to block ABA biosynthesis (Creelman *et al.*, 1992). Strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* cv. Elsanta) were used at mature G stages for this study. The other approach was silencing *FaNCED1* expression by RNAi. These approaches have been demonstrated to decrease ABA levels on ripen fruits. (Li *et al.*, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2014) The treatments were performed in accordance with (Medina-Puche *et al.*, 2014). The treated fruits were used for ABA content measurement and relative expression of *FaNCED1*, *FaCXE1* and *FaCXE2* gene.



To up regulate ABA content, fruits at the G3-W stages from *F. × ananassa* cv. Elsanta were harvested along with their pedicels. Water stressed fruits were kept with pedicel on air whilst control fruits maintained pedicels immersed in MS medium with sucrose (renewed every two days). The conditions of stress treatment and the samples analysis were performed following the instructions by (Medina-Puche *et al.*, 2014).

### **Preparation of deuterated abscisic acid, ABA extraction procedure and HPLC-MS conditions**

Deuterated abscisic acid (dABA) was used as an internal standard. Both the dABA preparation and ABA extraction from strawberry samples were performed following the instructions by (Medina-Puche *et al.*, 2014). 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 C<sub>18</sub> with 3 µm particle) (California, USA). The conditions and procedure used for the analysis were the same as described by (Medina-Puche *et al.*, 2014)

### **RNA isolation**

Achenes were always removed from frozen fruit surface and only receptacle RNA was extracted and purified. Total RNA was isolated from independent pools of strawberry receptacles at different growth and ripening stages and from vegetative tissues, in accordance with (Asif *et al.*, 2000). The total RNA obtained was treated with DNase I (RNase free) (Invitrogen), according to manufacturer's instructions, to remove genomic DNA contamination, after which it was purified by using the 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.

### **Expression analysis by quantitative real time PCR (qRT-PCR)**

Gene expression analysis of all genes herein studied were performed by quantitative real time PCR (qRT-PCR) using the iCycler (BioRad) system, as previously described (Benítez-Burraco *et al.*, 2003). First strand cDNA was obtained using 2 µg of total RNA and the iScript kit (BioRad), in accordance with the manufacturer's instructions. Each reaction was performed, at least, in triplicate, and the corresponding C<sub>t</sub> values were normalized using the C<sub>t</sub> value corresponding to an *interspacer 26S-18S* strawberry RNA gene (housekeeping gene), selected as control gene owing to its constitutive expression throughout all of the different tested experimental conditions (Amil-Ruiz *et al.*, 2013). All of these values were subsequently used to determine the relative increase or decrease in gene expression in the all samples in comparison to

that in the control gene in accordance with (Pedersen and Amtssygehus, 2001). The efficiency of each particular qRT-PCR and the melting curves of the products were also analysed in order to ensure existence of a single amplification peak corresponding to a unique molecular species. Primers used in these experiments are listed in Table 3.

**Table 3.** Primer sequences used in this work. Fw: forward; Rv: reverse. Up: upper; Low: lower.

Gene	Purpose	Primer	Sequence 5'-3'
<i>FaCXE2</i>	FLsequence	FaCXE2FL-Fw	gtagtagaattcATGGCTTCCACGACCAAAGAAATCGTCT
		FaCXE2FL-Rv	tactacctcgagCTAGACTAGAAAATCTGCCATCCGTTTG
	GFPfusion	CXE2-loc-up	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAACAATGGCTTCCACGACCAAAGAAATCGTCT
		CXE2-loc-lowlow	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGACTAGAAAATCTGCCATCCGTT
	qRT-PCR	CXE2-Up	CCCATTCCGGTTTCTGGGGA
		CXE2-Low	TCATCCTTCCAGCGACACA
RNAi construct	CXE2-RNAiUp	TACCACCACCGCTACCTCAA	
	CXE2-RNAiLow	TCCTTGCCAGCGACACAAAC	
<i>FaNCED1</i>	qRT-PCR	FaNCED1up	GAGCTTGAAGAGTGTGTGTCGAAA
		FaNCED1low	CGGTTACAGCAATGGCGAGATAAGCATA
<i>Interspacer26S-18S</i>	qRT-PCR	413fw	ACCGTTGATTCCGACAATTGGTCATCG
		413rv	TACTGGGGTCGGCAATCGGACG

### Generation of RNAi constructs and transfection of strawberry fruit by agroinfiltration

A 530 bp non-conserved region of *FaCXE2* and 477-bp conserved region from the *FaNCED1* genes were cloned independently 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 RNAi fragment in the silencing construct. The resulting fragment was cloned into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) and then transferred to the Gateway pFRN vector using LR clonase (Invitrogen). The generated RNAi constructs pFRN-*FaCXE2* and pFRN-*FaNCED1* were tested through sequencing and restriction analyses prior to strawberry fruit transformation.

The *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL0 (Lazo *et al.*, 1991) containing either the pFRN-*FaCXE2*, pFRN-*FaNCED1* or an empty pFRN as control were grown and independently injected into the base of whole strawberry fruits (cv. Elsanta) as described by (Hoffmann *et al.*, 2006) After 10 to 14 days, infiltrated fruits were harvested and analysed by qRT-PCR. A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agroinjected fruits were inoculated and analysed. Silencing extent was determined by comparing *FaCXE2* and *FaNCED1* transcripts levels in pFRN-*FaCXE2* and pFRN-*FaNCED1* agroinjected fruits against those containing the treated empty pFRN vector.

### Bioinformatics sequence analysis.

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/>) were used for the *in silico* analysis of the *FaCXE2* gene sequence. In order to align the nucleotide *FaCXE2* 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 76). 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 20 and the minimum width was set to 8 amino-acid residues (Bailey *et al.*, 2009) (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>). Major characteristic of proteins are listed in Table 1. Subcellular location was predicted by Cello (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), and Wolfpsort ([http://genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://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](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

### Subcellular location

The construct used for transient gene expression and localization studies was derived from binary vector pK7WGF2, which allows for the N-terminal fusion of the protein of choice with GFP (Karimi *et al.*, 2002). The 981-bp CDS of the strawberry *FaCXE2* gene was amplified and the PCR products were cloned into the entry vector pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen). The product was then transferred to the pK7WGF2 vector by LR recombination reaction (Invitrogen), resulting in a 35S::*GFP::FaCXE2* 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-*FaCXE2* 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 MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MES and 1mM acetosyringone). This step was repeated once and the concentration of bacterial suspension was measured by spectroscopy (OD<sub>600</sub>) and adjusted to a final concentration of 0.5-0.8. Then, the cells carrying the pK7WGF2-*FaCXE2* 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.

### **Cloning of full-length cDNA of *FaCXE2***

The full-length cDNA of *FaCXE2* was amplified from total cDNA of strawberry red fruit by using primers specially designed to match the initial and final transcription zones of the gene and then sequenced, these oligonucleotides introduced an EcoRI and an XhoI restriction site at the 5' and 3' ends of the *FaCXE2* 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.

### **Expression of recombinant *FaCXE2* protein in *Escherichia coli***

The vector pGEX-4T-1 (Amersham) was used for the expression of recombinant *FaCXE2* protein in *E. coli* cells (Blb21 Gold DE3 strain, Stratagene). The empty pGEX-4T-1 vector served as control for the experiments. The restriction sites EcoRI and a XhoI introduced in the pGEM-T easy construct with the *FaCXE2* gene sequence at the 5' and 3' ends respectively, were complementary to the restriction sites in the vector pGEX-4T-1 to obtain a frame fusion protein at the N-terminus. The expression construct (pGEX-4T-1-*FaCXE2*) was verified by restriction enzyme analysis and DNA sequencing before transformation into *E. coli*. For recombinant *FaCXE2* protein expression, 5 ml of an overnight liquid culture of transformed *E. coli* cells were grown in fresh LB medium supplied with appropriate antibiotics at 37°C until OD<sub>600</sub> = 0.6. Then, the culture was equilibrated to 16°C and induced with 1 mM isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG). After 12 hours of growth at 16°C, cells were harvested by centrifugation and the pellet was frozen for 15 min at -80°C. After this time, the cells were resuspended in 10 ml of 1 x ice-cold wash buffer (4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3) and sonicated on ice at least three times for 30 s with 10% energy using a sonicator (Sonopuls GM 2017, Bandelin). The sonicated cells were centrifuged at 4°C and 10 000g for 20 min. The soluble protein fraction (supernatant) was incubated in Telos filtration columns 15ml (Telos™ SPE Columns) with GST-sepharose (Novogen) for at least 60 min at 4°C. The protein attached to the sepharose was washed three times with 8 ml of 1 x ice-cold wash buffer at 4°C. Finally, the sepharose-bound protein was released by incubating for 5 min in 300 µl of 1x elution buffer (50 mM TRIS-HCl, 1 mM glutathione, pH 8) at room temperature. The eluted was quantified by Bradford's method (Bradford, 1976) and analysed by SDS-PAGE (12% Progel TRIS-Glycine, 1.0 mm, Anamed).

### **Enzyme Assay**

Esterase activity was assayed according to the method of (Gomori, 1953) as modified by (van Asperen, 1962). The assay mixture consisting of 5 mL of 0.3 mM 1-naphthyl acetate (a stock solution of 30 mM 1-naphthyl acetate prepared in acetone and diluted in 0.05 M sodium phosphate

buffer pH 7.0) and 50–100  $\mu\text{g}$  of enzyme was incubated at 27 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 1 mL of DBLS reagent (2 parts of 1% diazo blue B and 5 parts of 5% sodium lauryl sulphate). The absorbance of the developed color was measured at 600 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu\text{mol}$  of product per min at pH 7.0 and 27 °C. Protein concentration was determined according to the Bradford's method (Bradford, 1976).

## **Kinetic Studies**

### **Effect of Time**

The purified esterase was incubated with 1-naphthyl acetate for 10, 20, 30, 40, 50 and 60 mins at 27 °C. The reaction mixture in each case contained 5 mL of 0.3 mM substrate solution (a stock solution of 30 mM 1-naphthyl acetate was prepared in acetone and diluted to 100 fold with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) and 1 mL of purified esterase. The reaction was stopped by the addition of 1 mL of DBLS reagent (2 parts of 1% diazo blue-B (O-dianisidine, tetrazotised) and 5 parts of 5% sodium lauryl sulphate). The amount of 1-naphthol released for each time of incubation was determined from the standard graph of 1-naphthol.

### **Enzyme Concentration**

A typical esterase assay as described previously was carried out for purified esterase containing 25, 50, 75, 100, 125 and 150  $\mu\text{g}$  of protein. The amount of 1-naphthol released in each case was determined as described previously.

### **Substrate Specificity**

The substrate specificity of the purified esterase was tested using 1-naphthyl acetate, 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate. Esterase assay using 1-naphthyl acetate as substrate was done as described previously.

Esterase activity was measured by incubating the enzymes with 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate as substrate. The typical assay mixture in each case contained 5 mL of 0.3 mM substrate solution (a stock solution of 30 mM 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate were prepared in acetone and diluted to 100 fold with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) and 1 mL of enzyme extract. The reaction mixture was incubated for 15 min at optimum temperature and the reaction was arrested by the addition of 1 mL of DBLS reagent (2 parts of 1% diazo blue-B (O-dianisidine, tetrazotised) and 5 parts of 5% sodium lauryl sulphate). The reaction mixture was allowed to stand for 30 min and the intensity of the color formed was determined at 600 nm.

### **Influence of pH and Temperature on the Activity of Purified Esterase**

The effect of pH on the activity of the purified esterase was studied using the following buffers: (1) sodium citrate (0.05 M, pH 3.0–6.0), (2) sodium phosphate (0.05 M, pH 6.0–8.0), (3) Tris–HCl (0.05 M, pH 8.0–10.0). The catalytic activity of the enzyme in the above buffers was determined with 1-naphthyl acetate as substrate. Suitable controls were prepared using GST protein to determine the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The reaction was carried out at 27 °C for 15 min and 1-naphthol formed was determined colorimetrically.

Similarly, the effect of temperature on the activity of the purified esterase was studied at different temperatures ranging between 10 °C and 50 °C. The enzyme was diluted suitably and incubated with substrate, 1-naphthyl acetate at different temperature for 60 min. The amount of 1-naphthol released was measured colorimetrically. The incubated samples were rapidly cooled to -20 °C and assayed at optimum temperature. The amount of 1-naphthol released was measured colorimetrically.

### **K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub>**

The purified esterase was incubated with different concentrations of 1-naphthyl acetate, 1-naphthyl butyrate and 2-naphthyl hexanoate for 20 mins at optimum temperature and pH and the assay was carried out as described previously. The 1-naphthol formed in each concentration was determined colorimetrically.

### **Volatile extraction and identification**

For volatile determination, approximately 300mg of lyophilizate receptacle were transferred to 20mL glass vial and the protocol described by (Vallarino *et al.*, 2018) was followed. Briefly, for data acquisition, the vials were incubated at 50°C with agitation at 250rpm in an autosampler. The SPME holder is inserted 24 mm into the vial and keep for 20 min (extraction time), then the sample is injected in pulsed splitless mode, with the helium carrier gas flow set to 1mL/min. The injection temperature is set to 250°C and the Helium flow goes through the fiber at 250 °C for 5 min. Chromatography uses a 60 m DB-624 capillary column. The temperature program should be isothermal for 2 min at 40 °C, followed by a 10 °C per min ramp to 260 °C, and holding at this temperature for 10 min. Cooling should be as rapid as the instrument specifications allow. The recorded mass range should be m/z 30–300 at 2 scan per s. The compounds were identified using standards and/or GMD and NIST in our conditions as described by (Vallarino *et al.*, 2018).

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed with the GraphPad InStat program.

## References

- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., et al.** (2000) Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *Plant Cell*, **12**, 647. Available at: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3870992?origin=crossref>.
- Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S.** (2005) Molecular and Biochemical Characterization of 2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase. Involvement of Carboxylesterase-Like Proteins in Leguminous Isoflavone Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **137**, 882–891. Available at: doi: 10.1104/pp.104.056747.
- Amil-Ruiz, F., Garrido-Gala, J., Blanco-Portales, R., Folta, K.M., Muñoz-Blanco, J. and Caballero, J.L.** (2013) Identification and Validation of Reference Genes for Transcript Normalization in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Defense Responses. *PLoS One*, **8**.
- 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. Report.*, **18**, 109–115.
- Asperen, K. van** (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, **8**, 401–416.
- 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**, W202–W208. Available at: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp335>.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J. and Aharoni, A.** (2004) Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana. *Plant Physiol.*, **135**, 1865–1878.
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L. and Muñoz-Blanco, J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.*, **54**, 633–645.
- Bhat, R., Geppert, J., Funken, E. and Stamminger, R.** (2015) Consumers Perceptions and Preference for Strawberries—A Case Study from Germany. *Int. J. Fruit Sci.*, **15**, 405–424.
- Blanco-Portales, R., López-Raéz, J.A., Bellido, M.L., Moyano, E., Dorado, G., González-Reyes, J.A., Caballero, J.L. and 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. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11103-005-1966-z>.
- Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A. and Terrier, N.** (2015) BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytol.*, **208**, 695–707. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.13498>.
- Bradford, M.** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Cao, X., Duan, W., Wei, C., Chen, K., Grierson, D. and Zhang, B.** (2019) Genome-Wide Identification and Functional Analysis of Carboxylesterase and Methylsterase Gene Families in Peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Front. Plant Sci.*, **10**, 1–13.
- Cao, X., Xie, K., Duan, W., Zhu, Y., Liu, M., Chen, K., Klee, H. and Zhang, B.** (2019) Peach Carboxylesterase PpCXE1 Is Associated with Catabolism of Volatile Esters. *J. Agric. Food Chem.*, **67**, 5189–5196.

- 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.
- Chen, J.-Y., Wen, P.-F., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Wan, S.-B. and Huang, W.-D.** (2006) Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *J. Plant Physiol.*, **163**, 115–127. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161705002403>.
- 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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.99.3.1258>.
- Cummins, I., Landrum, M., Steel, P.G. and Edwards, R.** (2007) Structure activity studies with xenobiotic substrates using carboxylesterases isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **68**, 811–818. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206007886>.
- 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. *J. Exp. Bot.*, **63**, 4275–4290. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers120>.
- Cunnac, S., Wilson, A., Nuwer, J., Kirik, A., Baranage, G. and Mudgett, M.B.** (2007) A Conserved Carboxylesterase Is a SUPPRESSOR OF AVRBS1-ELICITED RESISTANCE in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 688–705. Available at: <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.106.048710>.
- D'Auria, J.C.** (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 331–340.
- Dudareva, N. and Pichersky, E.** (2008) Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 181–189.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P. and Casati, P.** (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.*, **3**. Available at: doi: 10.3389/fpls.2012.00222/abstract.
- Gershater, M.C. and Edwards, R.** (2007) Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Sci.*, **173**, 579–588. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945207002385>.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M.J.M., Quiles, J.L.J.L., Mezzetti, B. and Battino, M.** (2012) The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, **28**, 9–19. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900711003066>.
- Gomori, G.** (1953) Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.*, **42**, 445–53.
- González, M., Gaete-Eastman, C., Valdenegro, M., Figueroa, C.R., Fuentes, L., Herrera, R. and Moya-León, M.A.** (2009) Aroma development during ripening of *Fragaria chiloensis* fruit and participation of an alcohol acyltransferase (FaAAT1) gene. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 9123–9132. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf901693j>.
- Goulet, C., Kamiyoshihara, Y., Lam, N.B., Richard, T., Taylor, M.G., Tieman, D.M. and Klee, H.J.** (2015) Divergence in the Enzymatic Activities of a Tomato and *Solanum pennellii* Alcohol Acyltransferase Impacts Fruit Volatile Ester Composition. *Mol. Plant*, **8**, 153–162. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674205214000082>.
- Goulet, C., Mageroy, M.H., Lam, N.B., Floystad, A., Tieman, D.M. and Klee, H.J.** (2012) Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 19009–



19014.

- Hoffmann, T., Kalinowski, G. and 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**, 818–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092319>.
- Ileperuma, N.R., Marshall, S.D.G., Squire, C.J., Baker, H.M., Oakeshott, J.G., Russell, R.J., Plummer, K.M., Newcomb, R.D. and Baker, E.N.** (2007) High-Resolution Crystal Structure of Plant Carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and Its Complex with a High-Affinity Inhibitor Paraoxon. *Biochemistry*, **46**, 1851–1859. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi062046w>.
- Jetti, R.R., Yang, E., Kurnianta, A., Finn, C. and Qian, M.C.** (2007) Quantification of Selected Aroma-Active Compounds in Strawberries by Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography and Correlation with Sensory Descriptive Analysis. *J. Food Sci.*, **72**, S487–S496.
- 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. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.111.177311>.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992820>.
- Kessler, A.** (2001) Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* (80-. ), **291**, 2141–2144.
- Kim, S. and Lee, S.B.** (2004) Thermostable Esterase from a Thermoacidophilic Archaeon: Purification and Characterization for Enzymatic Resolution of a Chiral Compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2289–2298. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.68.2289>.
- Ko, M., Cho, J.H., Seo, H.-H., Lee, H.-H., Kang, H.-Y., Nguyen, T.S., Soh, H.C., Kim, Y.S. and Kim, J.-I.** (2016) Constitutive expression of a fungus-inducible carboxylesterase improves disease resistance in transgenic pepper plants. *Planta*, **244**, 379–392. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-016-2514-6>.
- Larsen, M. and Poll, L.** (1990) Odour thresholds of some important aroma compounds in raspberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **191**, 129–131.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A.** (1991) A DNA Transformation-Competent Arabidopsis Genomic Library in Agrobacterium. *Bio/Technology*, **9**, 963–967. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt1091-963>.
- Lee, S., Hwang, S., Seo, Y.W., Jeon, W.B. and Oh, B.-J.** (2013) Molecular characterization of the AtCXE8 gene, which promotes resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Plant Biotechnol. Rep.*, **7**, 109–119. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11816-012-0253-0>.
- Li, D., Li, L., Luo, Z., Mou, W., Mao, L. and 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 W. Lu, ed. *PLoS One*, **10**, e0130037. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130037>.
- Marshall, S.D., G.Putterill, J.J., Plummer, K.M. and Newcomb, R.D.** (2003) The Carboxylesterase Gene Family from *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Evol.*, **57**, 487–500. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-003-2492-8>.

- Matthews, C.K., Holde, K.E. van, Appling, D.R. and Anthony-Cahill, S.J.** (2013) *Biochemistry* 4th ed., Pearson Benjamin Cummings.
- Medina-Puche, L., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Cumplido-Laso, G., García-Caparrós, N., Moyano-Cañete, E., Caballero-Repullo, J.L., Muñoz-Blanco, J. and Rodríguez-Franco, A.** (2016) Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Funct. Integr. Genomics*, **16**, 671–692. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-016-0510-3>.
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., et al.** (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, F.J., Boersma, M., et al.** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiol.*, **168**, 598–614. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931522>.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F. and Veberic, R.** (2012) Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *J. Food Sci.*, **77**.
- Molina-Hidalgo, F.J., Franco, A.R., Villatoro, C., et al.** (2013) The strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1471–1483.
- Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Cañete-Gómez, C., et al.** (2017) The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J. Exp. Bot.*, **68**, 4529–4543. Available at: <http://academic.oup.com/jxb/article/68/16/4529/4067750/The-fruitspecific-transcription-factor-FaDOF2>.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J. and Robin, G.C.** (1999) Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, **21**, 1031–1042. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291521-1878%28199912%2922%3A1%3C1031%3A%3AAID-BIES7%3E3.0.CO%3B2-J>.
- Pedersen, S. and Amtssygehus, A.** (2001) Multiplex Relative Gene Expression Analysis by Real-Time RT-PCR Using the iCycler iQ Detection System. *BioRadiations*, **107**, 10–11. Available at: [http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_2696.pdf](http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2696.pdf).
- Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and Ripening of Strawberry Fruit. In *Horticultural Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., pp. 267–297. Available at: [doi.wiley.com/10.1002/9780470650585.ch8](http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650585.ch8).
- Qin, Y., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, L. and Zhang, S.** (2008) Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnol. Adv.*, **26**, 219–232.
- 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**, 1023–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517758>.

- Raguso, R.A.** (2008) Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **39**, 549–569.
- Satoh, T. and Hosokawa, M.** (2006) Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem. Biol. Interact.*, **162**, 195–211.
- Schwieterman, M.L., Colquhoun, T.A., Jaworski, E.A., et al.** (2014) Strawberry flavor: Diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception M. Kusano, ed. *PLoS One*, **9**, e88446.
- Souleyre, E.J.F., Marshall, S.D.G., Oakeshott, J.G., Russell, R.J., Plummer, K.M. and Newcomb, R.D.** (2011) Biochemical characterisation of MdCXE1, a carboxylesterase from apple that is expressed during fruit ripening. *Phytochemistry*, **72**, 564–571. Available at: doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.020.
- 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**, 4741–50. Available at: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err313>.
- Vallarino, J.G., Erban, A., Fehrle, I., Fernie, A.R., Kopka, J. and Osorio, S.** (2018) Acquisition of Volatile Compounds by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). In *Plant Metabolomics*. pp. 225–239. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7819-9\\_16](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7819-9_16).
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2006) In Planta Transformation of Arabidopsis. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2006**, pdb.prot4668-pdb.prot4668.
- Yan, J. wei, Ban, Z. jun, Lu, H. yan, Li, D., Poverenov, E., Luo, Z. sheng and Li, L.** (2018) The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: a review. *J. Sci. Food Agric.*, **98**, 4395–4402.
- Zabetakis, I. and Holden, M.A.** (1997) Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 421–434.



## **CONCLUSIONS**



**CONCLUSIONS**

## CHAPTER 1

- 1.- Three *FaPRE* genes with high homology level between them have been found in the strawberry genome.
- 2.- *FaPRE1* expression pattern is receptacle-specific, ripening-related and regulated by ABA and auxins while *FaPRE2* and *FaPRE3* expression is specific of vegetative tissues.
- 3.- *FaPRE1* antagonistically coordinates the transcription of genes related to both receptacle growth and ripening.
- 4.- *FaPRE1*, in ripened receptacle, represses the transcription of receptacle growth promoting genes while activating the transcription of those genes related to the receptacle ripening process.

## CHAPTER 2

- 5.- *FaMYB123* is an R2-R3 MYB TF whose gene expression is ripening related, restricted to the receptacle and positively regulated by ABA and negatively by auxins.
- 6.- *FaMYB123* control the expression of the late genes of the phenylpropanoid pathway, specifically the malonyl transferases.
- 7.- In *FaMYB123*-RNAi transgenics receptacles there is a disbalance between anthocyanin and proanthocyanin contents.
- 8.- *FaMYB123* is able to interact both *in-vitro* and *in-vivo* with FabHLH3, a regulator of proanthocyanin production.

## CHAPTER 3

- 9.- The injection of the demethylating compound 5-azacytidine lead to a complete stop of the ripening process.
- 10.- Transcriptome analysis revealed that transcriptional factor and enzymes related with ripening were repressed in the treated parts.
- 11.- Metabolomic studies showed an alteration of the primary and secondary metabolites, whose profiles were more similar to non-ripened receptacles.
- 12.- A disbalance between ABA and auxins was produced. A higher concentration of auxins and gibberellins while lower concentrations of ABA were accumulated in response to AZA treatment.

13.- *FaCXE2* is a gene that encodes an  $\alpha/\beta$  hydrolase similar to other carboxylesterases previously described.

14.- The *FaCXE2* expression is ripening-related, preferentially expressed in fruit and hormonally regulated positively by ABA and negatively by auxins.

15.- *In-vitro* *FaCXE2* activity reveals an optimal pH of 7.5 and an optimal temperature of 25°C. The recombinant protein shows most affinity towards longer chain esters.

16.- Transient downregulation of strawberry *FaCXE2* shows clear differences in the volatile content, presenting higher accumulation of esters and alcohol compounds were less concentrated.





