

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“Functional characterization of strawberry  
(*Fragaria × ananassa*) ripening-related genes  
identified throughout a custom-made  
oligo-based microarray platform”**

TESIS DOCTORAL

**Laura Medina Puche**

Córdoba, 2015

TITULO: *Caracterización funcional de genes reguladores del proceso de desarrollo, maduración y senescencia del fruto de fresa.*

AUTOR: *Laura Medina Puche*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**“Functional characterization of strawberry  
(*Fragaria × ananassa*) ripening-related genes  
identified throughout a custom-made  
oligo-based microarray platform”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Laura Medina Puche**, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Córdoba con la mención de *Doctorado Internacional*

Córdoba, septiembre de 2015.





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

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

### **Certificamos**

Que LAURA MEDINA PUCHE, Licenciada en Biología por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada **“Functional characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa*) ripening-related genes identified throughout a custom-made oligo-based microarray platform”**.

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, 22 de septiembre de 2015.

Dr. D. Juan Muñoz Blanco

Dra. Dña. Rosario Blanco Portales





**TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL: “Functional characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) ripening-related genes identified throughout a custom-made oligo-based microarray platform”.**

**DOCTORANDO/A: Laura Medina Puche**

**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).

La Lda. **Laura Medina Puche** ha desarrollado en el seno del grupo BIO-278 liderado por el Dr. Juan Muñoz Blanco el trabajo de investigación llamado “**Functional characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) ripening-related genes identified throughout a custom-made oligo-based microarray platform**” que constituye el tema de su Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor con Mención Internacional. Este trabajo de investigación ha sido dirigido y supervisado por el Dr. Juan Muñoz Blanco y la Dra. Rosario Blanco Portales, ambos miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Durante el periodo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis, la Lda. Medina Puche, además de haber desarrollado un correcto aprendizaje en el laboratorio que la ha permitido adquirir una amplia experiencia en diferentes técnicas de Biología Molecular (Microarrays, extracción de RNA, amplificación de RNA, generación de construcciones mediante tecnología Gateway, obtención e inducción de proteínas recombinantes, transformación de plantas de fresa de forma estable y transitoria, cultivo “*in vitro*” de plantas de fresa y las demás mostradas en el apartado de materiales y métodos de la tesis presentada), ha realizado dos estancias cortas (6 meses y medio en total) en los grupos de investigación dirigidos por el Dr. Willfried Schwab en el Departamento “Biomolecular food technology” de la Universidad Técnica de Munich (TUM) y el Dr. Robert C. Schuurink en el Departamento “Plant Physiology” perteneciente al Centro “Swammerdam Institute for Life Sciences” de la Universidad de Amsterdam (UvA) donde se realizaron parte de los análisis presentados en la tesis. Así, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han aislado varios genes, *FaNCED1*, *FaPRE1* y *FaEOBII*, directamente relacionados con la producción de ácido abscísico, la regulación de la morfología celular y la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides volátiles en el fruto de fresa, respectivamente. El hecho de que estos genes estén involucrados en el desarrollo de características tan determinantes en las propiedades finales del fruto de fresa hace este trabajo de investigación especialmente interesante desde el punto de vista biotecnológico y abre las puertas a la obtención de frutos de fresa mejorados en un futuro próximo. Por otra parte, los resultados incluidos en



la tesis y obtenidos por la Lda. Medina Puche tanto dentro del grupo BIO-278 como en colaboración con grupos de investigación de la Universidad de Málaga, Munich y Amsterdam han dado lugar a 25 comunicaciones a congresos, nacionales e internacionales y a 6 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, la Lda. Medina Puche también posee 3 manuscritos bajo revisión en la actualidad.

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

**“Functional characterization of a R2R3-MYB transcription factor, *EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBII)*, regulator of the volatile phenylpropanoids biosynthesis pathway in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits”**

**L. Medina-Puche**, R. Blanco-Portales, J. Muñoz-Blanco.

II Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación y III Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. Córdoba, Spain. Abril, 2013.

**“The strawberry *FaGAST2* gene determines receptacle cell size during fruit development and ripening”**

R. Blanco-Portales, M. L. Bellido, N. García-Caparrós, **L. Medina-Puche**, J. L. Caballero-Repullo, J. A. González-Reyes, J. Muñoz-Blanco and E. Moyano.

22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress. Seville, Spain. Septiembre, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Medina-Puche L.**, Muñoz-Blanco J., Blanco-Portales R.

I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación y II Congreso Científico de Investigadores en Formación del ceiA3. Córdoba, Spain. Mayo, 2012.

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

Molina-Hidalgo F.J., **Medina-Puche L.**, Moyano E., Pliego F., Mercado J.A., Rodriguez-Franco A., Caballero J.L., Muñoz-Blanco J.\*, Blanco-Portales R.  
VII International Strawberry Congress (ISS2012). Beijing, China. Febrero, 2012.

**“Microarray analyses of the strawberry fruit ripening process permit the selection of new candidate genes with potential biotechnological roles in strawberry fruit development, ripening and senescence”**

R. Blanco-Portales, M<sup>a</sup> Luz Bellido-Cabello de Alba, G. Cumplido-Laso, **L. Medina-Puche**, A. González, O. Trelles, E. Moyano, J.L. Caballero, J. Muñoz-Blanco.  
XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV) & XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana, Spain. Junio, 2011.

**“Caracterización funcional de un gen que codifica a una alcohol acil transferasa (FaAAT2) de fruto de fresa (*Fragaria* × *ananassa*)”**

Guadalupe Cumplido-Laso, **Laura Medina-Puche**, Bridget Moreno-Suárez, Enriqueta Moyano-Cañete, Wilfried Schwab, Juan Muñoz-Blanco, Rosario Blanco-Portales.  
XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Córdoba, Spain. Septiembre, 2010.

**“Estudios funcionales de una aldo-ceto reductasa (FaAKR3) en el proceso de maduración del fruto de fresa (*Fragaria* × *ananassa*)”**

Jose Antonio Mérida, Henrik Keränen, **Laura Medina**, Guadalupe Laso, Rosario Blanco, Juan Muñoz, Enriqueta Moyano. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Córdoba, Spain. Septiembre, 2010.

**“Using of an Strawberry Oligo Microarray Platform to Discover New Candidate Genes with Potential Biotechnological Roles in Strawberry Fruit Development, Ripening and Senescence”**

Blanco-Portales, Rosario; Moyano, Enriqueta; Cumplido-Laso, Guadalupe; **Medina-Puche, Laura**; Muñoz-Mérida, Antonio; Trelles, Oswaldo; Schwab, Wilfried; Caballero, José Luis; Muñoz-Blanco, Juan  
28th International Horticultural Congress. IHC. Lisbon, Portugal. Agosto, 2010.

**“Using of an Fruit Derived ESTs Microarray Platform to Discover New Candidate Genes with Potential Biotechnological Roles in Strawberry Fruit Development, Ripening and Senescence”**

Blanco-Portales, Rosario; Moyano, Enriqueta; Cumplido-Laso, Guadalupe; **Medina-Puche, Laura**; Muñoz-Mérida, Antonio; Trelles, Oswaldo; Schwab, Wilfried; Caballero, José Luis; Muñoz-Blanco, Juan.  
28th International Horticultural Congress. IHC. Lisbon, Portugal. Agosto, 2010.

**“Caracterización funcional de genes reguladores de la biosíntesis de ácido abscísico en receptáculo de fruto de fresa”**

**Laura Medina Puche**, Rosario Blanco Portales, Juan Muñoz Blanco.  
II Jornada Cultivo de la Fresa: Investigación e Innovación. Alcalá del Río, Seville, Spain. Diciembre, 2009.

**“Estudios funcionales de los genes NCEDs para la determinación del papel que desempeña el ácido abscísico en la maduración de la fresa”**

**Laura Medina Puche**, Rosario Blanco Portales, José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco.

I Congreso Científico de Investigadores en Formación . Córdoba, Spain. Octubre, 2009.

**“Using of an fruit derived ESTs microarray platform to discover new candidate genes with potential biotechnological roles in strawberry fruit development, ripening and senescence”**

Blanco-Portales R, Bellido-Cabello de Alba M Luz, Cumplido-Laso G, **Medina-Puche, L**, González A, Trelles O, Schwab W, Caballero JL, Muñoz-Blanco J.

The 8th Plant GEM. Lisbon, Portugal. Octubre, 2009.

**“Determinación del papel que desempeña el ácido abscísico en la maduración de la fresa mediante estudios funcionales de los genes NCEDs”**

**Laura Medina Puche**, Rosario Blanco Portales, Guadalupe Cumplido Laso, Bridget Moreno Suárez, MLuz Bellido Cabello de Alba, Carmen García Limones, Nicolás García Caparrós, José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

**“MADS-BOX genes involved in strawberry fruit ripening: identification of putative target genes regulated by FaMADS1 using microarray”**

MLuz Bellido Cabello de Alba, Rosario Blanco Portales, Enriqueta Moyano Cañete, Carmen García Limones, Guadalupe Cumplido Laso, Bridget Moreno Suárez, **Laura Medina Puche**, José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

**“Estudios funcionales de genes potencialmente reguladores del proceso de maduración de la fresa (*Fragaria × ananassa*)”**

Rosario Blanco Portales, Guadalupe Cumplido Laso, Bridget Moreno Suárez, **Laura Medina Puche**, Carmen García Limones, MLuz Bellido Cabello de Alba, Enriqueta Moyano Cañete, José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

**“Estudios de expresión y función fisiológica de una alcohol acil transferasa (FaAAT2) de fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*)”**

Guadalupe Cumplido Laso, **Laura Medina Puche**, Bridget Moreno Suárez, MLuz Bellido Cabello de Alba, Carmen García Limones, Nicolás García Caparrós, José Luis Caballero Repullo, Juan Muñoz Blanco, Rosario Blanco Portales.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

**“Caracterización funcional del gen que codifica una dioxigenasa de fresa (FaCCD1) involucrada en la degradación de luteína en fruto de fresa (*Fragaria × ananassa*)”**

Carmen García Limones, K. Schnäbele, Rosario Blanco Portales, MLuz Bellido Cabello de Alba, Guadalupe Cumplido Laso, Bridget Moreno Suárez, **Laura Medina Puche**,

Enriqueta Moyano, Nicolás García Caparrós, W. Schwab, José Luis Caballero, Juan Muñoz Blanco.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

**“Caracterización molecular de genes relacionados en procesos de resistencia a patógenos y en la maduración del fruto de fresa”**

Bridget Moreno Suárez, Guadalupe Cumplido Laso, **Laura Medina Puche**, MLuz Bellido Cabello de Alba, José Luis Caballero, Juan Muñoz Blanco y Rosario Blanco Portales.

IX Reunión de Biología Molecular de Plantas (IX BMP). Santiago de Compostela, Spain. Julio, 2008.

Los artículos de investigación publicados son:

**"An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles"**

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

Plant Physiology 168: 598-614

Impact factor: 6.841

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

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

Plant Science, 238: 198-211

Impact factor: 4.114

**"MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits"**

**Medina-Puche, L.\***, G. Cumplido-Laso\*, F. Amil-Ruiz, T. Hoffmann, L. Ring, A. Rodríguez-Franco, J. L. Caballero, W. Schwab, J. Muñoz-Blanco† and R. Blanco-Portales (2014).

Journal of Experimental Botany, 65(2): 401-417.

Impact factor: 5.242

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

Molina-Hidalgo, F. J., A. R. Franco, C. Villatoro, **L. Medina-Puche**, J. A. Mercado, M. A. Hidalgo, A. Monfort, J. Luis Caballero, J. Muñoz-Blanco† and R. Blanco-Portales (2013).

Journal of Experimental Botany, 64(6): 1471-1483.

Impact factor: 5.242

**“FaGAST2, a strawberry ripening-related gene, acts together with FaGAST1 to determine cell size of the fruit receptacle”**

Moyano-Cañete E, Bellido ML, García-Caparrós N, **Medina-Puche L**, Amil-Ruiz F, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J<sup>†</sup>, Blanco-Portales R. (2013).  
Plant & Cell Physiology 54: 218-236.  
Impact factor: 4.134

**"The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis"**

Cumplido-Laso, G., **L. Medina-Puche**, E. Moyano, T. Hoffmann, Q. Sinz, L. Ring, C. Studart-Wittkowski, J. Luis Caballero, W. Schwab, J. Muñoz-Blanco<sup>†</sup> and R. Blanco-Portales (2012).  
Journal of Experimental Botany, 63(11): 4275-4290.  
Impact factor: 5.3

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

**"Transcriptomic studies show that ABA and auxins play a dual role along the strawberry fruit receptacle developmental and ripening processes."**

**Laura Medina-Puche\***, Rosario Blanco-Portales\*, Francisco Javier Molina-Hidalgo, Guadalupe Cumplido-Laso, Nicolás García-Caparrós, Enriqueta Moyano Cañete, Juan Muñoz-Blanco<sup>†</sup> and Antonio Rodríguez-Franco (2015)

**"A DOF transcription factor (FaDOF1) regulates eugenol production in ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit receptacles."**

**Laura Medina-Puche\***, Francisco Javier Molina-Hidalgo\*, Carlos Cañete-Gómez, Irene López-Vidriero, Roberto Solano, José-Manuel Franco-Zorrilla, José Luis Caballero, Rosario Blanco-Portales, Juan Muñoz-Blanco<sup>†</sup>, Enriqueta Moyano (2015).

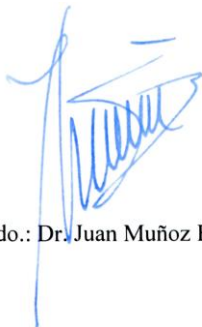
**"Functional characterization of FaPRE1, a ripening-related bHLH regulator involved in strawberry fruit receptacles elongation"**

**Laura Medina-Puche**, Molina-Hidalgo J, Juan Antonio García Gago, Jose Ángel Mercado Carmona, Fernando Pliego Alfaro, Caballero-Repullo J, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J<sup>†</sup> (2015).

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

Córdoba, 22 de septiembre de 2015

Firma del/de los director/es



Fdo.: Dr. Juan Muñoz Blanco



Fdo.: Dra. Rosario Blanco Portales

*A mis padres, Paco y Aurora*

***“Para bien de todos, trabajan y combaten los mejores” (Séneca)***

**“Strawberry fields forever” (The Beatles)**

*Let me take you down, 'cause i'm going to  
strawberry fields  
nothing is real  
and nothing to get hung about  
strawberry fields forever*

*Living is easy with eyes closed  
misunderstanding all you see  
it's getting hard to be someone, but it all works out  
it doesn't matter much to me*

*Let me take you down, 'cause i'm going to  
strawberry fields  
nothing is real  
and nothing to get hung about  
strawberry fields forever*

*No one, i think, is in my tree  
i mean, it must be high or low  
that is, you can't, you know, tune in, but it's alright  
that is, i think it's not too bad*

*Let me take you down, 'cause i'm going to  
strawberry fields  
nothing is real  
and nothing to get hung about  
strawberry fields forever*

*Always, no, sometimes, think it's me  
but, you know, i know when it's a dream  
i think, er, no, i mean, er, yes, but it's all wrong  
that is, i think i disagree*

*Let me take you down, 'cause i'm going to  
strawberry fields  
nothing is real  
and nothing to get hung about  
strawberry fields forever  
strawberry fields forever  
strawberry fields forever*



**“Fresh strawberries” (Franz Ferdinand)**

*We are fresh strawberries  
Fresh burst of red strawberries  
Ripe turning riper in the bowl  
We will soon be rotten  
We will all be forgotten  
Half remembered rumours of the old*

*So wouldn't it be easy with  
Something to believe in  
That could give us more  
Then here's my work  
So where's my pay to buy  
What I don't need  
Wouldn't it be easy to believe? To believe*

*Thieves believe  
Everybody steals  
But I believe there's nothing to believe  
But I love the manual  
The instruction manual  
Oh liars, Swear that they never lie*

*So wouldn't it be easy with  
Something to believe in  
That could give us more  
Then here's my years  
So now they've gone  
It's time for me to leave  
Wouldn't it be easy to believe? To believe*

*Wouldn't it be easy to believe?  
Wouldn't it be easy to believe?*

*We are fresh strawberries  
Fresh burst of red strawberries  
Ripe turning riper - so...*

*Wouldn't it be easy  
Something could give us more  
But I don't know  
No I don't know  
I don't know what I need*

*Wouldn't it be easy?  
Couldn't it be easy?  
Shouldn't it be easy?  
To believe*

## AGRADECIMIENTOS

Resulta paradójico que una tesis comience por lo último que se escribe, pero sin lugar a dudas GRACIAS es la mejor palabra con la que empezar. Es al final del camino cuando una se da cuenta de la importancia de la ayuda de todos los que me han rodeado durante estos años y que, en su medida, han hecho posible presentar este trabajo.

En primer lugar, agradecer a Juan y Jose Luis la oportunidad que me brindaron al abrirme las puertas de su laboratorio y a mis directores de tesis, Juan y Charo, su labor a lo largo de estos años. En especial, quisiera destacar la confianza que Juan ha depositado en mí durante todo este tiempo.

En segundo lugar, y aunque no os nombre a todos uno a uno (disculpadme, pero es que habeis sido muchísimos), quisiera dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio (Enri, Nico, Pepe, Bridget...), por vuestros consejos científicos, por los buenos ratos vividos dentro y fuera del laboratorio y por vuestro apoyo y ánimos cuando no todo eran risas. He aprendido mucho y guardo un magnífico recuerdo de cada uno de vosotros. Mil gracias. No obstante, me resulta imposible no acordarme a diario de Alba, Guada, Fran y Javi. De Alba me llevo las risas, las anécdotas, los viajes y la complicidad dentro y fuera del laboratorio. De Guada, su integridad, prudencia y sensatez. De Fran, su entrega y su dedicación incansables. Y de Javi, “mi compi”, me llevo esta tesis, y es que sin su apoyo y su buen hacer no habría sido lo mismo. Muchas gracias.

No puedo pasar por alto dar un gracias enorme a los grupos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Biología Celular del C6 como al Departamento de Genética del C5 que siempre me han recibido con una sonrisa y prestado su ayuda cada vez que la he necesitado. Y tampoco quisiera olvidarme de Conchi, Inés y Susana. Mil gracias.

Merecen un agradecimiento especial los profesores Dr. Wilfried Schwab de la Universidad Técnica de Múnich (TUM) y Dr. Robert Schuurink de la Universidad de Amsterdam (UvA) por permitirme desarrollar sendas estancias en sus laboratorios y poner a mi disposición cuanto he necesitado. En ambos casos ha sido una enriquecedora experiencia, tanto profesional como personal.

Se dice que quien tiene un amigo, tiene un tesoro. Y yo, en este sentido, me siento muy afortunada. Son muchos los amigos que me llevo, tanto de la carrera como de la tesis. Mis “bio-friends” Álvaro, Jesús, Ángel, Lucía, Tatiana y “mami”-Vane y mis “fritangos” David, Goyi, Pepe (por poner un puntito de sensatez y perspectiva), Sofía, Pepa, Tina y Julia (cada una distinta pero imprescindibles). Todos estos años no habrían sido lo mismo sin vosotros, vuestra amistad y la fuerza e ilusión que me habeis transmitido. En especial, millones de gracias a Tina y Julia (ellas ya saben porqué y sobran las palabras).

## AGRADECIMIENTOS

Pepe y Vicky, mis más mejores amigos, casi hermanos. Son muchos los recuerdos y muchos más que nos quedan por vivir. Gracias por vuestra amistad y apoyo incondicional.

A Fran, mi hermano, gracias por tu sentido del humor, tu respeto y por ser tan distinto a mí. Te deseo todo lo mejor, porque las buenas personas como tú lo merecen.

A mis abuelos, por su gran amor. Me habría gustado mucho compartir con todos este momento.

Pero sobre todo, esta tesis se la dedico a mis padres y les doy las gracias de todo corazón. Este trabajo es solo una pequeña muestra de todo el esfuerzo, sacrificio, entrega y dedicación que ellos han depositado en mí día tras día. Son espejo donde mirarse, un gran ejemplo y una meta que alcanzar. Todo lo bueno que hay en mí se lo debo sin duda a ellos.

Y por último, agradecer a mi diamante, un regalo de la vida. Gracias por tu escucha, fuerza e ilusión.

**TABLE OF CONTENTS**

Abreviaturas / Abbreviations _____	xxv
Summary of Figures / Listado de Figuras _____	xxxiii
Summary of Tables / Listado de Tablas _____	xxxvii
Summary of Appendices / Listado de Apéndices _____	xxxix
Summary _____	41
Resumen _____	47
Summary General Introduction _____	53
Introducción _____	63
1. La planta de fresa: generalidades _____	65
1.1. Origen, especiación y evolución	
1.2. Citología e interfertilidad	
1.3. Análisis filogenético	
2. Morfología del fruto de fresa _____	68
2.1. Los aquenios	
2.2. El receptáculo	
3. Composición del fruto de fresa _____	71
4. Fisiología del fruto de fresa _____	74
4.1. Cambios macroscópicos	
4.1.1. Crecimiento	
4.1.2. Elongación	
4.1.3. Maduración	
4.2. Cambios microscópicos	
4.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor	
<i>Carbohidratos</i>	
<i>Ácidos orgánicos</i>	
<i>Compuestos fenólicos</i>	
<i>Compuestos volátiles</i>	
4.2.2. Metabolismo de los fenilpropanoides: aparición del color	
4.3. Respiración	
4.4. Choque oxidativo	
5. Regulación hormonal del desarrollo y maduración del fruto de fresa _____	97
5.1. Auxinas	
5.2. Giberelinas y citoquininas	
5.3. Ácido abscísico	
5.4. Etileno	
5.5. Brasinoesteroides	
6. Control de la floración _____	106
7. Expresión génica durante el desarrollo y la maduración del fruto de fresa _____	108

8. Genes implicados en la mejora de fresa	114
8.1. Mejora de la planta de fresa frente a plagas y enfermedades	
8.1.1. Resistencia a agentes abióticos	
8.1.2. Resistencia a agentes bióticos	
8.2. Mejora de la floración y fructificación de la planta de fresa	
8.3. Mejora de la calidad del fruto de fresa mediante la modificación de sus propiedades organolépticas	
8.3.1. Manipulación del proceso de reblandecimiento	
8.3.2. Mejora del sabor	
8.3.3. Mejora del color	
9. Alérgenos de la fresa	128
10. Importancia económica del fruto de fresa	129
 Objectives	 133
 Summary General Methods	 137
 Materiales y Métodos	 155
 I. MATERIALES	 157
I.1. Material químico	157
I.1.1. Productos químicos	
I.1.2. Antibióticos utilizados	
I.1.3. Kits de biología molecular	
I.2. Material biológico	163
I.2.1. Material vegetal	
I.2.2. Estirpes bacterianas	
I.2.3. Estirpes de levaduras	
I.2.4. Vectores de clonación en <i>E. coli</i> .	
I.2.5 Vectores de expresión de proteínas	
I.2.6. Vectores binarios	
II. MÉTODOS	179
II.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	179
II.1.1. Extracción de ARN	
II.1.2. Extracción de ADN	
II.2. Cuantificación y visualización de ácidos nucleicos mediante electroforesis	181
II.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos	
II.2.2. Separación electroforética de ácidos nucleicos	
II.3. Manipulación de moléculas de ADN	183
II.3.1 Purificación de fragmentos de ADN	
II.3.2. Concentración de muestras de ADN	
II.3.3. Digestión de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción	
II.3.4. Ligación de moléculas de ADN	
II.3.5. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN	
II.3.6. Secuenciación	
II.4. Obtención de células competentes y transformación de bacterias	195
II.4.1. Preparación de células competentes permanentes de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y BL21	
II.4.2. Transformación de células de <i>E. coli</i> químicamente competentes	
II.4.3. Preparación de células competentes permanentes de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404, GV3101 y AGL0.	
II.4.4. Transformación de células de <i>A. tumefaciens</i> químicamente competentes	
II.4.5. Selección de transformantes bacterianos positivos	

II.4.6. Identificación de transformantes positivos	
II.5. Obtención de células competentes y transformación de levaduras	199
II.5.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (protocolo a pequeña escala).	
II.5.2. Obtención de células competentes y transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (protocolo a gran escala).	
II.5.3. Selección por aminoácidos	
II.6. Estudios de expresión génica	201
II.6.1. Tratamiento del ARN con <i>DNaseI</i>	
II.6.2. Comprobación de la pureza del ARN total	
II.6.3. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	
II.7. Obtención y análisis de la proteína recombinante FaNCED1	207
II.7.1. Aislamiento mediante RACE del ADNc completo correspondiente al gen <i>FaNCED1</i> y <i>FaPRE1</i>	
II.7.2. Clonación del ADNc correspondiente al gen <i>FaNCED1</i> en el vector pGEX-4T-1 (Amersham)	
II.7.3. Inducción de la proteína recombinante de fusión GST-FaNCED1	
II.7.4. Purificación de la proteína recombinante FaNCED1	
II.7.5. Análisis de la proteína recombinante FaNCED1	
II.7.6. Determinación de la actividad enzimática FaNCED1	
II.8. Generación y análisis de <i>microarray</i>	215
II.8.1. Anotación de secuencias a partir de una librería de ESTs	
II.9. Extracción de compuestos volátiles, pigmentos y hormonas del fruto de fresa	217
II.9.1. Extracción de compuestos volátiles	
II.9.2. Extracción de antocianinas y clorofila	
II.9.3. Extracción de ABA	
II.10. Generación de plantas transgénicas	219
II.10.1. Introducción a la metodología <i>Gateway</i>	
II.10.2. Principios básicos de la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	
II.10.3. Transformación estable de plantas de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Chandler”	
II.10.4. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> “Elsanta”.	
II.10.5. Transformación transitoria de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> a través de agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i> GV3101.	
II.11. Escrutinio de interacción mediante doble híbrido en levadura	230
II.11.1. Ensayos de auto-activación	
II.11.2. Escrutinio de interacción con una librería de expresión	
II.11.3. Identificación de transformantes diploides positivos de levadura	
II.12. Purificación de proteínas y determinación de motivos de unión al ADN	232
II.13. Aislamiento y <i>trans</i> -activación de promotores	233
II.14. Ensayos histológicos	234
II.14.1. Recolección y fijación del material biológico	
II.14.2. Inclusión en parafina	
II.14.3. Obtención de bloques y cortes histológicos	
II.14.4. Montaje de los cortes histológicos	
II.14.5. Tinciones histológicas	
II.15. Análisis estadístico de los datos	238
CHAPTER 1	
Functional characterization of FaNCED1, a key enzyme in the hormonal regulation of strawberry fruit ripening	239

Abstract	241
Introduction	241
Results	245
Functional characterization of FaNCED1, the key enzyme in ABA biosynthesis pathway	245
Identification of <i>FaNCED1</i> gene by cDNA microarrays analyses	
Isolation of <i>FaNCED1</i> and sequence analysis	
Enzymatic characterization of FaNCED1 protein expressed in <i>Escherichia coli</i>	
Determination of ABA as the key regulatory hormone of ripening process in strawberry fruits receptacles	251
The spatio-temporal expression pattern indicates that <i>FaNCED1</i> is mainly expressed in ripened receptacles and its expression correlates with ABA content along development and ripening of strawberry fruits	
<i>FaNCED1</i> expression in fruit receptacles is repressed by auxin and activated by ABA	
MEP-pathway related-genes expression is positively regulated by ABA	257
Discussion	260

## CHAPTER 2

Transcriptomic studies show that ABA and auxins play a dual role along the strawberry fruit receptacle developmental and ripening processes \_\_\_\_\_ 263

Abstract	265
Introduction	265
Results and Discussion	268
Qualitative and quantitative validation of the microarrays data	270
Functional annotation and enrichment analysis of the microarray	271
More relevant differentially expressed genes	271
Organoleptic properties-related genes	271
Fatty acids-derived and other lipophilic flavor compounds	273
Signalling and Regulatory proteins	282
<i>Up regulated TFs</i>	
<i>Other regulatory proteins</i>	
Hormonal related genes	296
<i>Abscisic acid (ABA) metabolism and signalling</i>	
<i>Auxins</i>	
<i>Ethylene</i>	
<i>Gibberellins</i>	
Transporters	303
Primary and secondary metabolism	308

## CHAPTER 3

An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles \_\_\_\_\_ 317

Abstract	319
Introduction	319
Results	323
Sequence analysis of the FaEOBII gene and protein	323

The expression of <i>FaEOBII</i> is highly expressed in ripe fruit receptacle and petals and correlates with eugenol production in both tissues	326
The expression of <i>FaEOBII</i> gene is hormonally regulated throughout receptacle fruit growth and ripening	331
<i>FaEOBII</i> can <i>transactivate</i> the promoters of genes involved in volatile phenylpropene production in strawberry fruit receptacles	334
<i>FaEOBII</i> can activate the promoter of <i>FvCAD1</i> that encodes a key enzyme of the eugenol metabolism	338
<i>FaEOBII</i> binds to MYB-binding sequences <i>in vitro</i>	339
<i>FaEOBII</i> expression is under the regulation of the FaMYB10 TF	340
Discussion	341
<i>FaEOBII</i> regulates the expression of two structural genes that play a key role in eugenol biosynthesis in fruit receptacles	341
<i>FvEGS2</i> and <i>FaEGS2</i> have different expression patterns that correlate with MBSII cis-regulatory elements in their promoters	342
<i>FaEOBII</i> expression is ripening related and correlates with eugenol production in different strawberry plant tissues	343
In ripe receptacles, eugenol production is regulated by the interaction between FaMYB10 and <i>FaEOBII</i>	343
<i>FaEOBII</i> expression is hormonally regulated in a similar way to that of other strawberry ripening-related TFs	344

## CHAPTER 4

### Functional characterization of *FaPRE1*, a ripening-related bHLH regulator involved in strawberry fruit receptacles elongation

Abstract	349
Introduction	350
Results	352
Isolation and characterization of <i>FaPRE1</i> gene and protein	352
Gene expression studies	356
Hormonal regulation of the <i>FaPRE1</i> gene in strawberry fruit receptacles	357
Hormonal regulation of <i>FaPRE1</i> gene expression in vegetative tissues from <i>in vitro</i> strawberry plants	359
<i>FaPRE1</i> protein is located in nucleus	360
<i>FaPRE1</i> overexpression in strawberry plants increases the size of the aerial parts, except leaves	361
Chlorophyll and anthocyanins levels are affected in <i>FaPRE1:OX</i> plants	362
<i>FaPRE1</i> overexpression alters the size and shape of the strawberry fruit receptacle cells	
<i>FaPRE1</i> overexpression induces <i>FaGAST1</i> and <i>FaGAST2</i> , both genes involved in cell morphology	366
Microarray data	367
<i>Functional analysis of the microarray</i>	
<i>Detection of differentially regulated genes</i>	
Yeast-two-hybrid screening	372
Discussion	374



TABLE OF CONTENTS

Conclusions	377
References	381
Additional files	409

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>1-MCP</b>	1-metilciclopropeno / 1-methylcyclopropene	
<b>1-NAAm</b>	1-naftalenacetamida / 1-naphthaleneacetamide	
<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; FaAAT2; 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>AFP</b>	proteínas anticongelantes de peces antárticos / antarctic fish antifreeze proteins	<i>AFP</i>
<b>AG</b>	AGAMOUS	<i>FaAG1</i>
<b>AGPasa</b>	ADP-glucosa pirofosforilasa / ADP-glucose pyrophosphorylase	
<b>AKR</b>	aldo ceto reductasa / aldo-keto reductase	
<b>ANR</b>	antocianidin reductasa / anthocyanidin reductase	<i>FaANR</i>
<b>ANS/LDOX</b>	antocianidin sintasa; leucoantocianidin dioxigenasa / anthocyanidin synthase; leucoantocianidin dioxygenase	<i>FaANS</i>
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico / ribonucleic acid	

*(table continues on following page)*

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<b>ARNasa/RNAsa</b>	ribonucleasa / ribonuclease	
<b>ARNi/RNAi</b>	ácido ribonucleico interferente / interfering ribonucleic acid	
<b>ARNm/RNA<sub>m</sub></b>	ácido ribonucleico mensajero / messenger ribonucleic acid	
<b>ARNr/RNA<sub>r</sub></b>	ácido ribonucleico ribosómico / ribosomal ribonucleic acid	
<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>BrEt</b>	bromuro de etidio / ethidium bromide	
<b>BRs</b>	brasinoesteroides / brassinosteroids	
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina / bovine serum albumin	
<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; 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; 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>
<b>CIAP</b>	fosfatasa alcalina / alkaline phosphatase	
<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	

*(table continues on following page)*

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<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-methoxy-3 (2H)-furanone	
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido / dimethyl sulfoxide	
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleótidos / deoxyribonucleotides	
<b>DO</b>	densidad óptica /	
<b>DTT</b>	ditiotreitól / dithiothreitol	
<b>EBGs</b>	genes tempranos reguladores de la biosíntesis del metabolismo de flavonoides/fenilpropanoides / early regulated biosynthesis genes	
<b>EDTA-Na<sub>2</sub></b>	ácido etilendiamino tetracético (sal disódica) / ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt)	
<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>EtOH</b>	etanol / ethanol	
<b>Etr2</b>	receptores de etileno de tipo-II / ethylene receptor type-II	<i>FaEtr1; FaETr2</i>
<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>FDP</b>	farnesil difosfato / farnesyl diphosphate	
<b>Fig.</b>	figura / figure	
<b>FISH</b>	hibridación <i>in situ</i> fluorescente / fluorescence <i>in situ</i> hybridization	

(table continues on following page)

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<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>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa / $\beta$ -glucuronidase	
<b>HDMF</b>	4-hydroxy-2,5-dimetil-3(2H)-furanona / 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H)-furanone (furanol)	
<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>
<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>IASI</b>	invertasa ácida soluble / soluble acid invertase	
<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	

*(table continues on following page)*

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<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>MBP</b>	proteína de unión a la maltosa / maltose binding protein	
<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>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> -dioxygenase 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>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida / polyacrylamide gel electrophoresis	
<b>PAL</b>	fenilalanina amonio-liasa / phenylalanine ammonia lyase	<i>FaPAL</i>
<b>PAS</b>	Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff / periodic acid-Schiff	
<b>pb/bp</b>	pares de bases / base pairs	

*(table continues on following page)*

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<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>PEG</b>	polietilenglicol / polyethylene glycol	
<b>PG</b>	poligalacturonasa / polygalacturonase	<i>FaPG</i>
<b>PGIP</b>	polygalacturonase-inhibiting protein / polygalacturonase-inhibiting protein	<i>PGIP</i>
<b>pI</b>	punto isoeléctrico / isoelectric point	
<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>PMSR</b>	metionina sulfóxido reductasa / methionine sulfoxide reductase	<i>Fapmsr; FaPMSR</i>
<b>PRs</b>	genes relacionados con la patogénesis / pathogenesis-related genes	<i>FaPR</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>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real / quantitative real time PCR	
<b>QTL</b>	locus de un carácter cuantitativo / quantitative trait locus	
<b>RACE</b>	amplificación rápida de extremos de ADNc / rapid amplification of cDNA ends	
<b>RAPD</b>	ADN polimórfico amplificado al azar / Randomly Amplified Polymorphic DNA	
<b>RGA</b>	genes análogos a la resistencia / Resistance Gene Analogs	
<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	

(table continues on following page)

<b>ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS</b>		
<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>SA</b>	ácido salicílico; salicilato / salicylic acid; salicylate	
<b>SCAI</b>	Servicio Central de Apoyo a la Investigación / Central Service for Research Support	
<b>SCAR</b>	regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas / Sequence Characterized Amplified Region	
<b>SDH</b>	sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente / sorbitol dehydrogenase NAD-dependent	<i>FaSDH</i>
<b>SDS</b>	duodecil sulfato sódico / sodium dodecyl sulfate	
<b>SFL</b>	locus de floración estacional / seasonal flowering locus	
<b>SKDH</b>	shikimato deshidrogenasa / shikimate dehydrogenase	
<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>TLC</b>	cromatografía de capa fina / thin layer chromatography	
<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 OF FIGURES / LISTADO DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

**Figura 1:** Morfología de la planta de fresa

**Figura 2:** Perfil de floración y crecimiento vegetativo de la planta de fresa a diferentes temperaturas

**Figura 3:** Estructura típica del fruto de fresa

**Figura 4:** Identificación de los frutos primarios, secundarios y terciarios en una planta de fresa

**Figura 5:** Crecimiento del receptáculo del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración

**Figura 6:** Modelo propuesto para la estructura de la red de pectinas presente en la lámina media y pared celular primaria del fruto de fresa

**Figura 7:** Diagrama de las rutas de biosíntesis comprometidas con el metabolismo de los fenilpropanoides

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

**Figura 9.** A. Cambios hormonales que suceden en un fruto genérico durante el desarrollo y maduración. B. Espectro de dependencias al ABA y al etileno en la maduración

**Figura 10:** Principales países productores de fresa en el mundo

**Figura 11.** Producción de fresa en España y área cultivada

**Figura 12:** Exportaciones mundiales de fresa

### MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

**Figura 4:** Vector de expresión pGEX-4T-1

**Figura 5:** Vector de expresión pDEST-TH1

**Figura 6:** Vector pDEST<sup>™</sup>22

**Figura 7:** Vector pDEST<sup>™</sup>32

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

**Figura 9:** Vector de expresión pK7WG2.0

**Figura 10:** Vector de expresión pK7WGF2.0

**Figura 11:** Vector de expresión pKGWFS7.0

**Figura 12:** Ejemplo de curvas de amplificación en un *iCycler iQ system* (Bio-Rad)

**Figura 13:** Curva de *melting* correspondiente a los amplicones generados por qRT-PCR en el sistema *iCycler iQ system* (Bio-Rad)

### CHAPTER 1

**Figure 1:** Sequence alignment of NCED proteins using the MultiAling Program

**Figure 2:** Phylogenetic analysis of FaNCED1-related dioxygenase

**Figure 3:** Purification of FaNCED1-GST recombinant protein from induced *E. coli* culture

**Figure 4:** Thin-layer chromatography of assays with (+) and without (-) crude extract containing fusion protein FaNCED1-GST

**Figure 5:** LC-MS<sup>n</sup> analysis of C<sub>25</sub> product isolated after TLC

**Figure 6:** Developmental expression of strawberry *FaNCED1* gene in receptacles of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” and ABA content determined by HPLC-MS

**Figure 7:** (A) Developmental expression of strawberry *FaNCED1* gene in achenes and different fruit stages of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” and ABA content quantified by HPLC-MS on achenes and receptacles analyzed. (B) Analysis by quantitative real-time PCR of strawberry *FaNCED1* expression in vegetative tissues and different fruit stages

**Figure 8:** Analysis by qRT-PCR of *FaNCED1* gene expression in different strawberry cultivars

**Figure 9:** Analysis of the effects of removing achenes from G2 developing fruits of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” on *FaNCED1* expression by quantitative real-time PCR using specific primers

**Figure 10:** Analysis by qRT-PCR of *FaNCED1* gene expression and quantification by HPLC-MS of ABA content

**Figure 11:** Schematic diagram of the MVA- and MEP- Pathway

**Figure 12:** Analysis by qRT-PCR of the strawberry MEP-Pathway related genes expression

**Figure 13:** Analysis by qRT-PCR of the strawberry MEP-Pathway related genes expression in (A) NDGA treated fruits, (B) NCED1-RNAi fruits and (C) fruits under water stress conditions

## CHAPTER 2

**Figure 1:** Venn Diagram using significantly deregulated genes by ABA and auxins

## CHAPTER 3

**Figure 1:** Screenshots corresponding to the results of prediction of domains and functional sites performed with InterProScan database and prediction of protein localization sites in cells performed with the WoLF PSORT computer program

**Figure 2:** Nuclear location of FaEOBII protein in plant cells

**Figure 3:** Sequence alignment of R2R3-MYB proteins

**Figure 4:** Phylogenetic tree of 206 MYB transcription factors

**Figure 5:** Analysis by quantitative real-time PCR of *FaEOBII* expression in developing fruit receptacles (A), achenes (B) and plant tissues (C) of *Fragaria × ananassa* “Camarosa”

**Figure 6: Analysis of spatio-temporal changes in gene expression and content of eugenol.** (A) Bars represent developmental expression of strawberry *FaODO1*, *FaEGS1*, *FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2* genes in receptacles of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” obtained by qRT-PCR. (B) Bars represent relative expression values of *FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2* genes in overripe receptacles versus petals

**Figure 7: Analysis of gene expression changes and eugenol content.** (A) Analysis by qRT-PCR of *EOBII*, *EGS2* and *CAD1* gene expression in red ripe receptacles of the cultivated variety of strawberry

*Fragaria* × *ananassa* “Camarosa” and in the wild varieties of strawberry *F. vesca* “mutant white” and *F. vesca* “wild red”. (B) GC-MS quantification of eugenol in strawberry fruits varieties

**Figure 8:** Schematic diagram of *EGS2* promoter from *F. × ananassa* and *F. vesca* varieties using PLACE online database and DOG 2.0.1 for Windows

**Figure 9:** Analysis of the effects of removing achenes from G2 developing fruits of *Fragaria* × *ananassa* “Camarosa” on *FaEOBII* expression by quantitative real-time PCR

**Figure 10:** Analysis by quantitative real-time PCR of *FaEOBII* and *FaNCED1* expression and quantification of ABA concentration

**Figure 11:** *FaEOBII* silencing effect on the expression of the structural genes belonging to the volatile phenylpropanoid biosynthesis pathway. (A) Schematic diagram of the Phenylpropanoid Pathway in Plants. (B) Analysis by qRT-PCR of expression of genes involved in the Phenylpropanoid Pathway in *FaEOBII*-silenced fruits.

**Figure 12:** GC-MS quantification of eugenol, qRT-PCR analysis and anthocyanin measurements in *FaEOBII* transitory transgenic fruit receptacles

**Figure 13:** *Trans*-activation of the *CAD1* promoter of *Fragaria vesca* and the *ODO1* promoter of *Petunia hybrida* cv. Mitchell by *EOBII* in *Nicotiana benthamiana* leaves

**Figure 14:** Identification of *FaEOBII*-binding motifs *in vitro*

**Figure 15:** Quantitative real-time PCR analysis of *FaMYB10* and *FaEOBII* transcript levels and eugenol and anthocyanin content determination in transgenic agroinfiltrated fruits injected with the corresponding RNAi construct

## CHAPTER 4

**Figure 1:** Screenshots corresponding to the results of protein localization sites prediction in cells performed with the Plant-mPloc computer program and prediction of domains and functional sites performed with InterProScan database

**Figure 2:** Sequence alignment of bHLH proteins

**Figure 3:** Phylogenetic tree of 182 bHLH transcription factors

**Figure 4:** Analysis by quantitative real-time PCR of *FaPRE1* expression in developing fruit receptacles, achenes and vegetative tissues of *Fragaria* × *ananassa* “Camarosa”, and ripe receptacles of different strawberry varieties

**Figure 5:** Analysis by quantitative real-time PCR of the hormonal effects in *FaPRE1* gene expression using specific primers

**Figure 6:** Phenotypic analysis of *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” *in vitro* plants grown in N30K medium supplemented with hormones

**Figure 7:** Subcellular localization of the *FaPRE1* protein in *Nicotiana benthamiana* leaves

**Figure 8:** Phenotypic analysis of the transgenic *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” plants transformed with the pK7WG2-*FaPRE1* construct 30 days after their acclimation in soil

**Figure 9:** PCA test of independent transgenic lines overexpressing *FaPRE1* compared to control plants

**Figure 10:** Cellular changes in transgenic crown and root overexpressing *FaPRE1* gene compared with the control crown and root respectively

**Figure 11:** Phenotypic analysis of the transgenic *Fragaria × ananassa* “Chandler” plants transformed with the pK7WG2-*FaPRE1* construct 60 days after their acclimation in soil

**Figure 12:** Phenotype and analysis by qRT-PCR of *FaPRE1* gene expression in floral button of transgenic plants overexpressing *FaPRE1* compared with the control plants

**Figure 13:** Cellular changes in transgenic floral button overexpressing the *FaPRE1* gene compared with the control

**Figure 14:** Analysis by qRT-PCR of *FaGAST1* and *FaGAST2* gene expression in floral button of control and transgenic line 9 using *FaGAST1* and *FaGAST2* specific primers

**Figure 15:** Venn Diagram using all differentially expressed genes for *FaPRE1* gene silencing and overexpressing experiments

## SUMMARY OF TABLES / LISTADO DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

**Tabla 1:** Distribución de las especies de fresa en el mundo (*Fragaria* L.)

**Tabla 2:** Número medio de inflorescencias y estolones presentes en plantas de fresa de día corto y neutro sometidas a cuatro temperaturas diferentes a lo largo de tres meses

**Tabla 3:** Composición del fruto de fresa

**Tabla 4:** Compuestos más representativos que intervienen en el aroma del fruto de fresa

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 1:** Antibióticos empleados en este trabajo

**Tabla 2:** Cebadores universales empleados

**Tabla 3:** Cebadores específicos empleados en la comprobación de construcciones

**Tabla 4:** Cebadores específicos empleados en qRT-PCR, amplificación, clonación y secuenciación de fragmentos de los genes de secuencia conocida indicados

**Tabla 5:** Programa para la amplificación por PCR de fragmentos de ADN

**Tabla 6:** Programa de *melting* empleado para la generación de curvas de fusión

### CHAPTER 1

**Table 1:** Carotenoid cleavage dioxygenase aminoacid sequences

### CHAPTER 2

**Table 1:** Summary of *Fragaria* × *ananassa* differentially expressed genes.

**Table 2:** Manual annotation of differentially regulated aroma-related genes sorted into the four R-up clusters

**Table 3:** Manual annotation of differentially regulated cell wall-related genes sorted into the four R-up clusters

**Table 4:** Manual annotation of differentially regulated flavonols/phenylpropanoi metabolism-related genes sorted into the four R-up clusters

**Table 5:** Manual annotation of differentially regulated lipid metabolism-related genes sorted into the four R-up clusters

**Table 6:** Manual annotation of differentially regulated genes coding for transcription factors sorted into the four R-up clusters

**Table 7:** Manual annotation of differentially regulated genes coding for signalling and regulatory proteins sorted into the four R-up clusters

**Table 8:** Manual annotation of differentially regulated hormonal-related genes sorted into the four R-up clusters

**Table 9:** Manual annotation of differentially regulated genes coding for transporters sorted into the four R-up clusters

**Table 10:** Manual annotation of differentially regulated genes involved in primary and secondary metabolism sorted into the four R-up clusters

### CHAPTER 3

**Table 1:** Microarray data from transcriptomic comparison between transgenic transiently-silenced *FaEOBII* fruits and control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector

### CHAPTER 4

**Table 1.** Genes commonly regulated under both experimental conditions: A) silencing *FaPRE1* (*FaPRE1*-RNAi array), B) overexpression *FaPRE1* (OX-*FaPRE1* array)

**Table 2.** Yeast-two-hybrid screening

## SUMMARY OF APPENDICES / LISTADO DE APÉNDICES

### MATERIALES Y MÉTODOS

- Apéndice 1:** Composición de los medios de cultivo bacterianos
- Apéndice 2:** Composición de los medios de cultivo de levaduras
- Apéndice 3:** 10 x “Drop-out solution”
- Apéndice 4:** Soluciones utilizadas para la obtención y purificación de ARN
- Apéndice 5:** Soluciones empleadas en la electroforesis de ácidos nucleicos
- Apéndice 6:** Mezcla de digestión enzimática
- Apéndice 7:** Reacción de ligación
- Apéndice 8:** Enzimas empleadas en la desfosforilación y ligación de moléculas de ADN
- Apéndice 9:** Soluciones empleadas en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN
- Apéndice 10:** Soluciones empleadas en la preparación de células competentes
- Apéndice 11:** Soluciones empleadas en la obtención de células competentes y transformación de *E. coli*
- Apéndice 12:** Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a pequeña escala
- Apéndice 13:** Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a gran escala
- Apéndice 14:** Tratamiento de ARN con *DNaseI*
- Apéndice 15:** RACE
- Apéndice 16:** Obtención del ADN copia completo (“full-length”)
- Apéndice 17:** Poliadenilación
- Apéndice 18:** Obtención del ADN copia completo (“full-length”) flanqueado por sitios de restricción
- Apéndice 19:** Soluciones empleadas para la inducción y purificación de la proteína recombinante
- Apéndice 20:** Soluciones empleadas para la electroforesis de geles de poliacrilamida. Soluciones empleadas para la coloración/decoloración de geles de poliacrilamida
- Apéndice 21:** Mezcla de reacción para el ensayo enzimático de FaNCED1
- Apéndice 22:** Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen™)
- Apéndice 23:** Medios y soluciones empleadas en la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de *Fragaria × ananassa* “Chandler”
- Apéndice 24:** Medios y soluciones empleadas en la transformación transitoria de *Fragaria × ananassa* “Elsanta” con *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0
- Apéndice 25:** Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pDONR™221 (Invitrogen™)





# **SUMMARY**

## SUMMARY

**SUMMARY****“Functional characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa*) ripening-related genes identified throughout a custom-made oligo-based microarray platform”**

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

One of the selected genes (*FaNCED1*) showed significant homology of sequence with genes of higher plants encoding 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases (NCEDs), key enzymes in the production of abscisic acid (ABA). These enzymes are described as the last enzyme that acts into the plastids in the ABA biosynthetic pathway, catalyzing the cleavage of the precursor C<sub>40</sub>-xanthophylls (9-*cis*-neoxanthin and 9-*cis*-violaxanthin) to produce C<sub>25</sub> epoxy apo-aldehyde and xanthoxin that is released into the cytosol and finally gives rise to ABA. It has been proposed that, in non-climacteric fruits such as strawberry, grape and citrus; ABA plays an important role in regulating the maturation of the fruit, much more than that undertaken by ethylene. In this work, we have observed a clear correlation between the increase in *FaNCED1* gene expression and the increase of ABA content along the strawberry maturation. Furthermore, it has been found that its expression is negatively regulated by auxins synthesized in the achenes.

On the other hand, I assessed the enzymatic activity of the recombinant protein FaNCED1 derived from the full-length *FaNCED1* cDNA. The recombinant enzyme showed activity only in the presence of precursors in the *cis* configuration located one step upstream in ABA biosynthesis pathway, allowing identify, at least, one of the two products. Therefore, these results suggest that the FaNCED1 protein is related to the production of ABA.

After the transient silencing of *FaNCED1* gene expression, it was observed a significant reduction not only of ABA content but also of anthocyanin accumulation in the transgenic strawberry fruits, somehow slowing the entry of the fruit into ripeness stages. These findings suggest that FaNCED1 enzyme could control the ripening process through the production of this phytohormone.

Taking into account these results and using our oligo microarray platform, I have studied the transcriptomic changes that occur in the receptacle of the strawberry fruit when auxin and ABA levels are reduced during development and maturation respectively. This analysis allowed selecting several target genes potentially involved in the ripening and whose expression is negatively regulated by auxins and positively regulated by ABA.

One of the selected genes was a transcription factor belonging to the MYB family (FaEOBII), which is involved in regulating the production of phenylpropanoid volatiles. This R2R3 MYB TF showed significant homology of sequence with its homologue described in *Petunia*, PhEOBII, a flower-specific regulator of structural scent-related genes and phenylpropanoid volatiles production. Transcript levels of *FaEOBII* are specific and highly represented in ripe fruit receptacle and petals and correlate with eugenol content in both tissues. Furthermore, using a protein-binding microarray platform, it was determined that FaEOBII binds to MYB-binding sequences (MBS) *in vitro* and trans-activates *in vivo* promoters containing these *cis*-regulatory elements such as the promoter of *Fragaria vesca* *FvCAD1* gene that encodes a key enzyme of the eugenol metabolism. Besides, transcriptome analysis of transgenic fruits with the *FaEOBII* expression transiently silenced indicated that only two genes involved in the metabolism of flavonoids/phenylpropanoid volatiles, *eugenol synthase 2* (*FaEGS2*) and *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (*FaCAD1*), may be positively regulated by this TF. Also, a parallel reduction of the content of eugenol in these fruits was detected. Opposite effects were obtained when *FaEOBII* was overexpressed. Thus, these findings indicate that FaEOBII TF plays a key role in the production of the eugenol scent compound in strawberry fruit receptacle during ripe stage.

The next gene selected to be studied was a transcription regulator belonging to the basic helix-loop-helix family (bHLH), *FaPRE1*, whose homologue in *A. thaliana* and rice is

involved in regulating the size and shape of parenchymal cells of the leaves. According to its aminoacidic sequence, FaPRE1 contains a HLH domain highly conserved but lacks the basic region at the amino terminal. Based on these features, FaPRE1 can be classified into the atypical bHLH subgroup of the 32 plant bHLH subfamilies. In this work, it has been observed a correlation between the increase in *FaPRE1* gene expression and the increase in the ratio length/width of strawberry fruit receptacle along development and ripening stages. Transcriptomic analysis of *FaPRE1* gene expression indicate that in fruit receptacle is regulated negatively by auxins, positively by ABA and no significant changes were detected under gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) treatments, while in vegetative tissues GA<sub>3</sub> treatments induced an increase of *FaPRE1* expression and morphological changes leading to elongated plants.

Stable transgenic plants overexpressing *FaPRE1* were generated and phenotypically analyzed. Overexpression of *FaPRE1* produced elongated plants as a result of an increase in the length of the aerial parts (petioles and crowns) however no significant changes were detected in the size of leaves although chlorophyll and anthocyanin content were altered in these tissues respect to wild type plants. Also, fruit receptacles showed a greater elongation corroborated by histological analysis that showed a different size and shape of mesenchymal cells as well as a different tissue organization. Transcriptomic studies of these transgenic receptacles combined with transient silencing of *FaPRE1* in fruit receptacles allowed the identification of a small group of common genes differentially regulated under both conditions respect to control fruits. Among them, it was identified a subgroup of genes that belong to cell wall functional group identified as cell wall-modifying enzymes. Besides, overexpression of *FaPRE1* led to a down-regulation of two cell elongation-related genes (*gene29570*, *ovate family protein* (AOF) and *gene21137*, *BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYLS 4* (*BILA*)) promoting cell elongation simultaneously through two independent routes, GA and BR signalling respectively, placing putatively FaPRE1 in the middle of a crossroads between paths.



## **RESUMEN**





**RESUMEN****“Caracterización funcional de genes de fresa (*Fragaria × ananassa*) relacionados con la maduración identificados a través de una plataforma de microarrays de oligos hecha a medida”**

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

Uno de los genes seleccionados (*FaNCEDI*) mostraba homología de secuencia significativa con genes de plantas superiores que codifican 9-*cis*-dioxigenasas de epoxicarotenoides (NCEDs), descritas como enzimas claves en la producción de ácido abscísico (ABA). Estas enzimas han sido descritas como la última enzima que actúa en el interior de los plastidios en la ruta de biosíntesis de ABA, catalizando el corte del precursor C<sub>40</sub>-xantofilas (9-*cis*-neoxantina y 9-*cis*-violaxantina) para producir C<sub>25</sub> epoxi-apo-aldehído y xantosina que es liberada al citosol donde finalmente da lugar a ABA. Se ha propuesto que en frutos no-climatéricos como fresa, uva y cítricos, ABA juega un importante papel en la regulación de la maduración de los mismos, mucho más que el llevado a cabo por el etileno. En este trabajo, se ha observado una clara correlación entre el incremento de la expresión génica de *FaNCEDI* y el contenido de ABA a lo largo de la maduración de la fresa. Además, se ha encontrado que la expresión de *FaNCEDI* está regulada negativamente por las auxinas sintetizadas en los aquenios.

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática de la proteína recombinante FaNCED1 derivada de la secuencia completa de ADN copia de *FaNCEDI*. La enzima recombinante mostró actividad solamente en presencia de precursores en configuración *cis* localizados un paso corriente arriba en la ruta de biosíntesis de ABA, permitiendo identificar, al menos, uno de los dos productos de la

reacción. Por consiguiente, estos resultados sugieren que la proteína FaNCED1 está relacionada con la producción de ABA.

Tras el silenciamiento transitorio de la expresión de *FaNCED1*, se observó una reducción significativa no sólo del contenido de ABA sino también de la acumulación de antocianinas en los frutos transgénicos generados, marcador inequívoco de la entrada en los estadios de maduración. Por tanto, de alguna manera, a través del silenciamiento de *FaNCED1* se ralentizó la entrada del fruto en las etapas de maduración. Estos hallazgos sugieren que FaNCED1 podría controlar el proceso de maduración a través de la producción de la fitohormona ABA.

Teniendo en cuenta estos resultados y usando una plataforma de microarrays de oligos, se estudiaron los cambios transcriptómicos que tienen lugar en el receptáculo del fruto de fresa cuando los niveles de auxinas y ABA son reducidos durante el desarrollo y la maduración, respectivamente. Este amplio análisis permitió seleccionar varios genes de interés potencialmente implicados en el proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa y cuya expresión presentara una regulación negativa por auxinas y positiva por ABA.

Uno de los genes candidatos seleccionado fue un factor de transcripción (FT) de tipo MYB (*FaEOBII*), el cual está implicado en la regulación de la producción de compuestos fenilpropanoides volátiles. Este FT de tipo R2R3-MYB mostró una elevada homología de secuencia respecto a su homólogo en *Petunia*, *PhEOBII*, un regulador específico de flores de los genes estructurales relacionados con aroma y la producción de fenilpropanoides volátiles. Los niveles de transcrito de *FaEOBII* son elevados y altamente representados en receptáculos de fruto maduro y pétalos y se correlaciona con el contenido de eugenol en ambos tejidos. Además, usando una plataforma de microarray de unión de proteínas (*protein-binding microarray platform*) se determinó *in vitro* que *FaEOBII* se une a secuencias promotoras de tipo MYB (MYB-binding sequences; MBS) y que *in vivo* trans-activa promotores que contienen este tipo de elementos *cis*-reguladores como el promotor del gen *FvCAD1* que codifica para una enzima clave del metabolismo del eugenol. También, el análisis transcriptómico de los frutos transgénicos generados con la expresión de *FaEOBII* silenciada transitoriamente indicó que sólo dos genes implicados en el metabolismo de los

flavonoides/fenilpropanoides volátiles, *eugenol sintasa 2 (FaEGS2)* y *cinamil alcohol deshidrogenasa (FaCAD1)*, estaban positivamente regulados por este FT. En paralelo, una reducción en el contenido de eugenol en dichos frutos fue determinada. Efectos opuestos fueron obtenidos cuando *FaEOBII* fue sobre-expresado. Así, estos hallazgos indican que *FaEOBII* juega un papel clave en la regulación de la producción de eugenol en receptáculos de fruto de fresa maduros.

El siguiente gen seleccionado para su estudio fue un regulador transcripcional perteneciente a la familia de FT bHLH (*basic helix-loop-helix*), *FaPRE1*, cuyos homólogos en *A. thaliana* y arroz están implicados en la regulación del tamaño y la forma de las células del parénquima de las hojas. En base a su secuencia aminoacídica, *FaPRE1* contiene un dominio HLH altamente conservado pero carece de la región básica en el extremo amino. Según esto, *FaPRE1* puede clasificarse dentro del subgrupo 16 de bHLH atípicos de las 32 subfamilias de bHLHs de plantas. En este trabajo se ha observado una correlación entre el incremento de la expresión de *FaPRE1* y el ratio longitud/anchura del receptáculo del fruto de fresa a lo largo de las etapas de desarrollo y maduración del mismo. Análisis transcriptómicos de *FaPRE1* indican que la expresión de este gen en el receptáculo está regulada negativamente por auxinas, positivamente por ABA y no presenta cambios significativos bajo tratamientos con ácido giberélico, mientras que en tejidos vegetativos de plántulas *in vitro* tratadas con giberelinas se indujo la expresión de *FaPRE1* y se produjeron cambios morfológicos que condujeron a fenotipos elongados.

Se generaron plantas transgénicas estables sobre-expresando *FaPRE1* que daban lugar a plantas con fenotipos elongados como resultado de un incremento en la longitud de las zonas aéreas de la planta (peciolos y coronas), sin embargo no se detectaron cambios en el tamaño de las hojas aunque sí en el contenido de clorofila y antocianinas respecto a las plantas control. Además, estos frutos transgénicos mostraron una mayor elongación corroborada mediante análisis histológicos que revelaron diferente forma y tamaño de las células mesenquimáticas así como una organización anormal de las células de estos tejidos. Estudios transcriptómicos de estos receptáculos transgénicos en combinación con frutos con la expresión de *FaPRE1* silenciada transitoriamente permitieron la identificación de un pequeño grupo común diferencialmente regulados bajo ambas condiciones respecto a frutos control. Entre ellos, se ha identificado un subgrupo de

genes que pertenecen al grupo funcional de pared celular identificados como enzimas modificadoras de la pared celular. Además, la sobre-expresión de *FaPRE1* condujo a la reducción de la expresión de dos genes relacionados con la elongación celular (*gene29570*, *ovate family protein* (AOF) y *gene21137*, *BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYLS 4* (BIL4)), promoviendo finalmente fenotipos de elongación celular a través de dos rutas de señalización diferentes mediadas a través de giberelinas y brasinoesteroides, situando a *FaPRE1* en el medio de un cruce entre dos vías independientes.

# **SUMMARY GENERAL INTRODUCTION**



## SUMMARY GENERAL INTRODUCTION

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

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

Strawberry fruit has been classified as non-climacteric, since there is no concomitant burst of respiration and ethylene production that triggers to the ripening process. Thus, all changes related with the fruit ripening occur without a significant increase in ethylene production, which suggests that this process is independent of this hormone (Iwata *et al.*, 1969a and 1969b; Villareal *et al.*, 2010). The strawberry fruit has a maximum respiration at the transition between stages ripe to overripe.



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

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

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

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

The hormonal regulation of the fruit development and maturation is one of the most studied processes in strawberry. Auxin produced by the achenes inhibits the fruit ripening in the green stage and, when the IAA concentration declines in the receptacle due to the achenes lignification, the fruit development and ripening begin (Given *et al.*, 1988b). This suggests that the auxin stimulates the elongation of the fruit while repress its maturation. In parallel, a maximum activity of both, cytokinins and gibberellins, has been detected mainly in achenes 7 days after anthesis. It has been suggested that the GAs could control the induction of cell division in subapical tissues of axillary buds while that variations in the concentration of cytokinins are important in the process of flowering of strawberry plants (Eshghi and Tafazoli, 2007; Hytönen *et al.*, 2009). Additionally, GAs also participates in the differentiation of axillary buds regulated by photoperiod (Hytönen *et al.*, 2009). On the other hand, the abscisic acid (ABA) is also very important in the strawberry development. Generally, this phytohormone is involved in seed maturation, acquisition of tolerance to senescence, in vegetative growth, and in the physiological responses that confers tolerance to water and osmotic stress (Mishra *et al.*, 2006). Moreover, the ABA slows down the growth in plants subjected to water stress by the restriction of ethylene production (Sharp, 2002) and acts over the biotic response (Fan *et al.*, 2009). In strawberry fruit, this hormone is accumulated in both achenes and receptacles after 20 days post anthesis. This increase is concomitant with the decrease of IAA level in both tissues, therefore the ratio ABA / IAA might be sufficient to drive genetic changes that occurs during the transition of elongation phase to fruit ripening phase (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). ABA seems to play a crucial role in the regulation of fruit ripening as the application of exogenous ABA promotes the ripening of strawberry (Jia *et al.*, 2011). The *FaNCED1* gene silencing, which encodes an important protein in ABA biosynthesis, reduced the

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

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

The flavor of strawberry fruit is determined by the complex mixture of volatile compounds and other constituents (such as sugars, organic acids, phenolics and tannins), although esters are one of the most important groups of volatile compounds associated with the aroma of strawberry. Of all these compounds, about one hundred different types have been identified but only some of them contribute decisively to determine to the final fruit aroma (Zabetakis and Holden, 1997). In ripe strawberry fruit, the most abundant volatile esters are ethyl butanoate, 2-methyl-ethyl butanoate and ethyl hexanoate. One of enzymes involved in the formation of these esters is the alcohol acyl transferase (AAT) that catalyzes the transfer of the acyl group from acyl-CoA to an

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

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

The formation of flowers on the strawberry plant is induced at low temperatures and short photoperiods while the floral bud development depends of the temperature and day length. Auxins and cytokinins also play an important role in this process. To improve the strawberry crop, adaptability and disease resistance are studying the effect

on the development and fruiting of plants changing their hormonal regulation. These changes can be achieved by introducing genes able to alter the endogenous regulation of plant growth. Other tool used for manipulating endogenous phytohormones is the transformation of strawberry plants with oncogenes from *A. rhizogenes* or *A. tumefaciens* (Zuker *et al.*, 2001; Casanova *et al.*, 2005).

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

The strawberry is also susceptible to many diseases and plagues that cause significant economic losses due to expenditure on plant treatments and reducing production. Therefore, the improvement of the strawberry natural resistance by genetic manipulation is an important research objective. For instance, the loci *Rfp1* is associated with the resistance to *Phytophthora fragaria* (Haymes *et al.*, 1997). Moreover, polygenic factors present additive effects against *Verticillium dahliae* (Zebrowska *et al.*, 2006). The strawberry plants produce volatile organic compounds (VOC), which have antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* (Arroyo *et al.*, 2007). In addition, Fragarina is a small molecule that responses to stress processes (Filippone *et al.*, 1999). Finally, transgenic strawberry plants with high levels of chitinase reduce the harm effects caused by the oidium fungus (Asao *et al.*, 1997; Asao *et al.*, 2003).

In general, the programs of biotechnology and breeding of berries have as priority the improvement of the fruit quality. For these fruits, the taste (result of the combination of sweetness, acidity and aroma), and firmness are of great economic importance and,

therefore, the genes involved in these processes are being studied by transgenesis. However and, although the evaluation of the transgenic gene function can be a valuable tool for the selection of genes, is quite slow.



# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

## 1. La planta de fresa: generalidades

### 1.2. Origen, especiación y evolución

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

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

La especie diploide *Fragaria vesca* también ha sido considerada como un antepasado de la variedad cultivada octoploide. Recientemente, se ha secuenciado el genoma de esta especie (Shulaev *et al.*, 2011) y la información obtenida, junto con la disponibilidad de ESTs (*expressed sequence tag*) de especies cultivadas y el desarrollo de técnicas de transformación de estas variedades, permitirán en un futuro el desarrollo de estudios de ADN recombinante y genómica entre diferentes especies de rosáceas (Bombarely *et al.*, 2010).

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

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

## 1.2. Citología e interfertilidad

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

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

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

### 1.3. Análisis filogenético

A partir de ADN procedente del cloroplasto (ADNcp) y secuencias ITS (espaciadores de transcripción interna) de la región nuclear, se han determinado las relaciones filogenéticas entre

las diferentes especies de *Fragaria* (Harrison *et al.*, 1997; Potter *et al.*, 2000). Dentro de esta filogenia, se ha encontrado un grupo formado por varias especies monofiléticas (p. ej.: *F. viridis* y *F. nilgerrensis*) y otro mayor formado por *F. vesca*, *F. bucharica* (antes *F. nubicola*) y los poliploides de *Fragaria*.

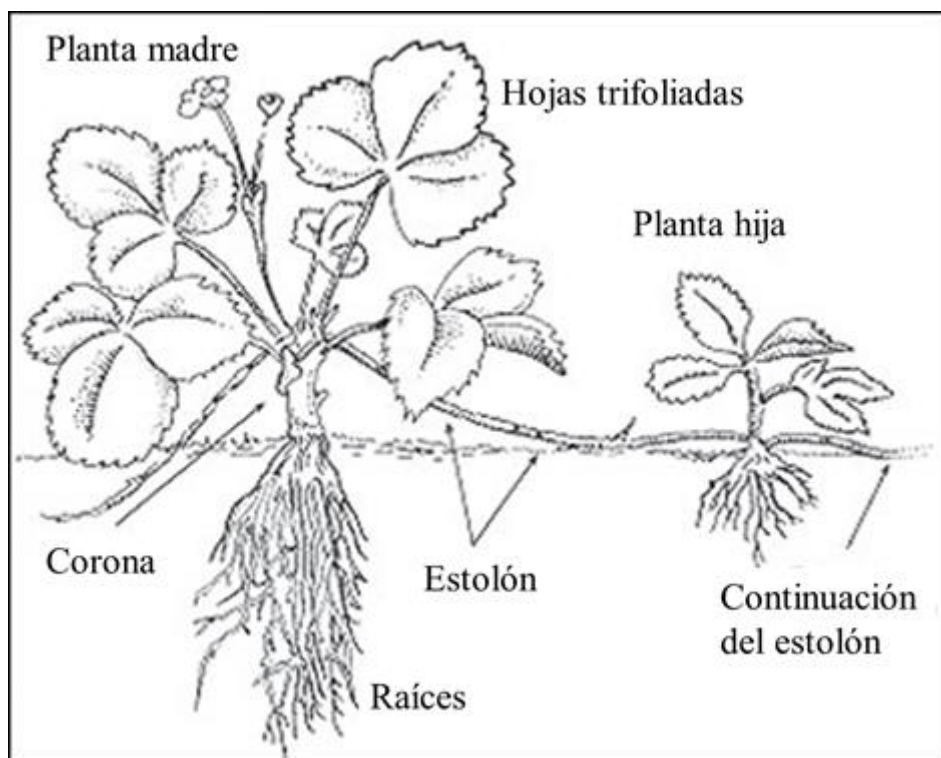
Sargent (2005) estudió con mayor profundidad las relaciones filogenéticas entre muchos de los diploides de *Fragaria* utilizando datos de secuencias ITS y cuatro regiones ADNcp. De esta manera, se determinó una filogenia que agrupaba los diploides en tres clases: la primera contenía una sola especie,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

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

## 2. Morfología del fruto de fresa

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

La planta de fresa posee un tallo central comprimido en una roseta basal o corona. A partir de ella emergen raíces de tipo fasciculado y hojas trifoliadas dentadas de haz glabrescente y envés con pelos aplicados, cuyos peciolos pueden alcanzar los 20 cm de altura. En la axila de cada hoja, existe una yema o meristemo axilar a partir de la cual pueden desarrollarse estolones o inflorescencias, dependiendo de las condiciones medioambientales. Los estolones, o tallos rastreros, producen raíces adventicias de las que pueden surgir eventualmente nuevas plantas (reproducción asexual) (Figura 1).



**Figura 1: Morfología de la planta de fresa.**

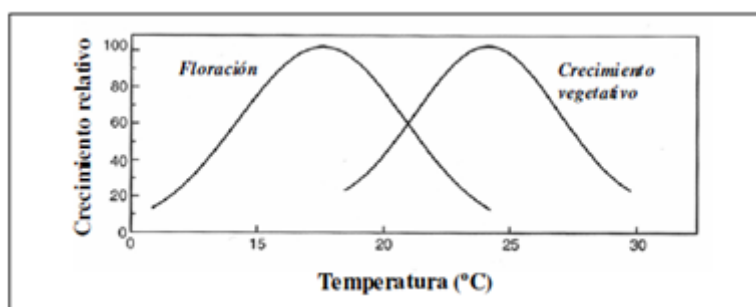
En general, la planta de fresa se reproduce sexualmente mediante la formación de pequeñas inflorescencias de pétalos blancos, generalmente hermafroditas, y receptáculo amarillo. En los cultivares de día corto, las inflorescencias se generan cuando los días son cortos y las temperaturas frías, mientras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

Aunque los términos día neutro y remontante se suelen usar como sinónimos, las variedades remontantes son producto de una selección natural en zonas continentales y nórdicas mientras que las variedades de día neutro, con comportamiento fisiológico y productivo similar, son producto de la mejora genética tradicional que busca la ruptura de la dependencia del fotoperiodo para incrementar la producción durante todo el año.

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

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

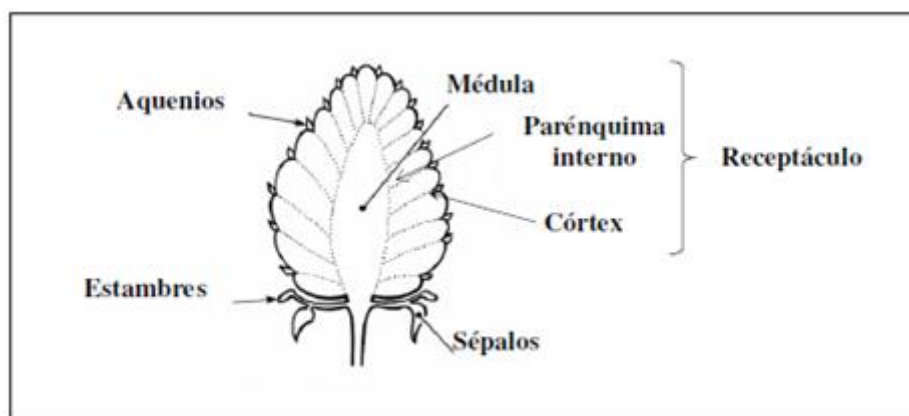
Temperatura (°C)	<i>Día corto</i>		<i>Día neutro</i>	
	Inflorescencias	Estolones	Inflorescencias	Estolones
18/14	2,1	0,0	3,3	1,7
22/18	0,3	0,0	1,3	2,3
26/22	0,0	0,8	0,0	2,2
30/26	0,0	2,4	0,0	3,3



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

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

La fresa se desarrolla a partir de una flor con un gineceo coricárpico (donde cada carpelo representa un carpido) y en la que el androceo se ha multiplicado de modo secundario por intercalación. A partir de los carpelos se forman frutos monocarpelares indehiscentes (aquenios) que se disponen sobre la superficie del eje floral, el cual adopta un aspecto cónico y una textura carnosa (receptáculo) para dar lugar a un fruto múltiple (Erendorfer, 1983) (Figura 3). Por tanto, la fresa es un fruto que posee una estructura de falso fruto constituido por un receptáculo carnoso en cuyo exterior se encuentran los aquenios (verdaderos frutos).



**Figura 3: Estructura típica del fruto de fresa.** (Adaptado de Hancock, 1999).

### 2.1. Los aquenios

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

### 2.2. El receptáculo

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

## 3. Composición del fruto de fresa

El fruto de fresa es el tejido sumidero más importante de la planta, acumulando entre el 20-40 % del total del peso seco de ésta. La fructificación inhibe la producción de estolones, coronas e inflorescencias, sin embargo, no afecta generalmente a los niveles totales de peso seco en la



planta salvo en raíz, donde se produce una reducción de la biomasa durante dicho proceso (Hancock, 1999).

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

Los principales azúcares solubles de la fresa son la glucosa y fructosa, que constituyen más del 80 % de los azúcares totales y el 40 % del peso total seco (Wrolstad y Shallenberger, 1981). La glucosa, la fructosa y la sacarosa son los azúcares solubles que están presentes en el fruto de fresa en todas las etapas de maduración. La glucosa y la fructosa se encuentran casi a concentraciones iguales (Maas *et al.*, 1996, Ornelas-Paz *et al.*, 2013), incrementando de forma continua durante el desarrollo de la fruta y pasando de un 5 % en frutas verdes pequeñas a un 6,9% en las bayas de color rojo (Kader, 1991). Los niveles de sacarosa son generalmente mucho más bajos y muestran una pequeña acumulación cerca del desarrollo de la fruta (Forney y Breen, 1985). Las invertasas probablemente desempeñan un papel importante en la regulación de la dulzura del fruto mediante el control de sus niveles de sacarosa y hexosas (Ranwala *et al.*, 1992; Manning, 1998). Por otro lado, ha sido descrito recientemente el papel regulador en la maduración de fresa desempeñado por la sacarosa (Jia *et al.*, 2013). En este trabajo, se ha demostrado la correlación entre los niveles del contenido de sacarosa en receptáculo con los de ácido abscísico (ABA). La reducción del contenido de sacarosa en fruto se consiguió a través

del silenciamiento mediante ARN interferente del receptor de sacarosa FaSUT1, seguida de una disminución de los niveles de ABA que condujo a un retraso en la maduración del fruto de fresa. En cambio, la sobre-expresión de *FaSUT1* dio lugar a un incremento del contenido de sacarosa, seguido de un aumento de ABA, acelerando el proceso de maduración (Jia *et al.*, 2013).

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

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

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

Recientes investigaciones han proporcionado evidencias sustanciales que clasifican las fresas como un alimento funcional con beneficios para la salud, tanto preventivos como terapéuticos (Basu *et al.*, 2014). Las fresas son una rica fuente de fitoquímicos (ácido eláxico, antocianinas, quercetina y catequina) y vitaminas (ácido ascórbico y ácido fólico), así como de polifenoles y antioxidantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos factores bioactivos pueden ser afectados significativamente por las diferencias entre cultivares, las prácticas agrícolas, al

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

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

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

##### **4.1. Cambios macroscópicos**

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

###### **4.1.1. Crecimiento**

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

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

El tamaño del fruto también está influenciado por la posición que éste ocupa en la inflorescencia, de manera que su tamaño es menor según se trate de frutos primarios, secundarios o terciarios (Moore *et al.*, 1970) (Figura 4). Este hecho podría estar relacionado con un periodo de retraso tras la polinización, más largo en el caso del crecimiento del fruto secundario y terciario (Moore *et al.*, 1970). La eliminación de los frutos primarios de la planta motiva un incremento del peso de los frutos secundarios, lo cual parece indicar que se produce una competencia entre los frutos semejante a la dominancia apical en el vástago (Stutte y Darnell, 1987). Se sabe que las diferencias en el tamaño final del fruto están determinadas genéticamente y que éstas están relacionadas con el número y tamaño de los aquenios viables desarrollados en el mismo (Moore *et al.*, 1970).

El fruto de fresa crece rápidamente y, dependiendo de las condiciones medioambientales, alcanza su tamaño total y definitivo aproximadamente 30 días después de la antesis. La cinética de su crecimiento parece variar con el cultivar, presentando algunos de ellos una única fase de crecimiento sigmoideal (Woodward, 1972; Forney y Breen, 1985; Stutte y Darnell, 1987), mientras que otros presentan modelos bifásicos de crecimiento (Archbold y Dennis, 1984; Perkins-Veazie y Huber, 1987). Se ha sugerido que el crecimiento bimodal del receptáculo está relacionado con el desarrollo del endospermo y del embrión dentro de los aquenios (Perkins-Veazie y Huber, 1987), de manera que el segundo periodo de crecimiento acelerado coincide

con la maduración del embrión en los achenios, fenómeno que acompaña a la maduración del receptáculo. Hasta el décimo día tras la polinización, se puede observar un crecimiento logarítmico del peso fresco del receptáculo debido a un aumento de la división y alargamiento celular. A partir del día 20 después de la polinización, aparece una segunda fase de incremento rápido del peso fresco. Posteriormente, a los 25 días, comienza a observarse cambio de color, quedando completada la maduración a los 30 días tras la polinización. Se ha descrito que hay un incremento en la división celular de hasta tres veces durante los primeros 7 días después de la polinización, mientras que todo el crecimiento posterior es debido a la expansión celular (Knee *et al.*, 1977) (Figura 5).

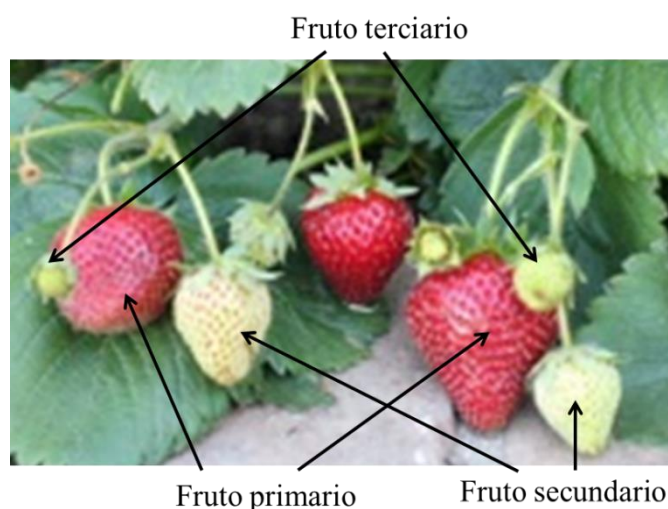


Figura 4: Identificación de los frutos primarios, secundarios y terciarios en una planta de fresa.

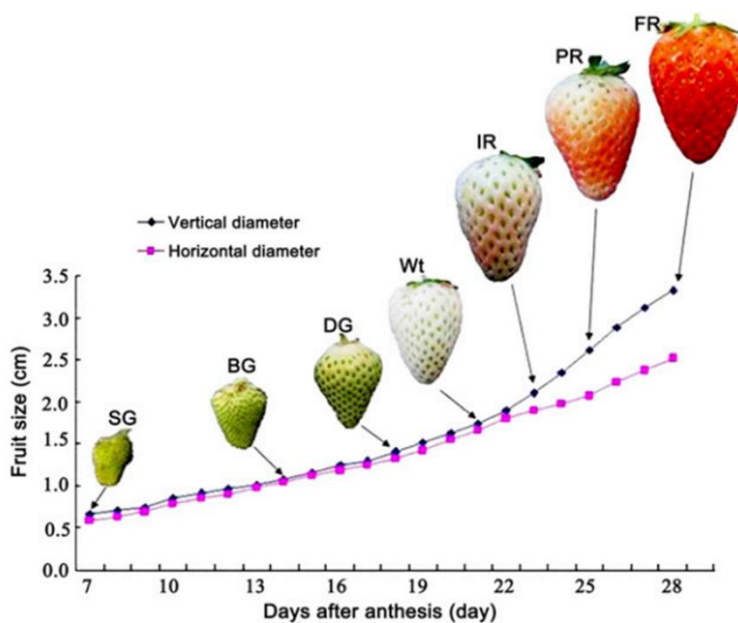


Figura 5: Crecimiento del receptáculo del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración. (Extraído de Jia *et al.*, 2011)

#### 4.1.2. Elongación

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

#### 4.1.3. Maduración

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

La firmeza de la fruta es una de las propiedades más importantes a la hora de determinar el grado de madurez y la calidad del fruto y ésta viene determinada por la turgencia celular y por las características y composición de la pared celular. De hecho, el reblandecimiento del fruto comienza con la modificación de la pared celular primaria debida a la solubilización y despolimerización de los polisacáridos que forman parte de ella. Rosli *et al.* (2004) estudió la composición y estructura de los polisacáridos de la pared celular del fruto de fresa durante su desarrollo y maduración en tres cultivares con diferente firmeza (“Camarosa”, la más firme; “Toyonaka”, de firmeza media; y “Pájaro”, la más blanda), y comprobó que las principales

diferencias entre ellas radicaba en el contenido de polisacáridos de la pared. En general, se observó que la cantidad de hemicelulosa y celulosa disminuyó durante la maduración del fruto en los tres cultivares evaluados, pero no hubo diferencias en su contenido en etapas maduras. Esto sugiere que este polisacárido no tiene un papel fundamental en el reblandecimiento del fruto de fresa (Rosli *et al.*, 2004; Palomer *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 2014).

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

Las expansinas están íntimamente implicadas en el proceso de reblandecimiento de la fresa. Su actividad se ha detectado a lo largo de la maduración del fruto, identificándose siete genes diferentes que codifican expansinas (*FaExp 1-7*) (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Un estudio sobre su expresión en varias variedades con diferente firmeza, mostró una correlación directa entre la firmeza del fruto y los niveles de expresión en tres de los siete genes *FaExp* de fresa identificados. Además, los niveles de expresión de las expansinas estudiadas fueron mayores en los frutos procedentes de la variedad más blanda (“Toyonaka”) que en las variedades más duras (“Camarosa” y “Selva”) (Dotto *et al.*, 2006), lo que indica una correlación clara entre la expresión de estos genes y el proceso de maduración. Por otra parte, también se ha detectado un incremento de expresión de las expansinas justo al principio del comienzo de la maduración en el cultivar más blando, lo que apoya directamente la intervención de estas enzimas en el proceso de maduración de la fresa (Dotto *et al.*, 2006). Salentijn *et al.* (2003) analizaron la existencia de diferencias transcriptómicas relacionadas con la firmeza del fruto en diferentes variedades empleando la tecnología de microarrays de ADN. A partir de los datos obtenidos, seleccionaron varios genes candidatos que mostraron expresión diferencial en las variedades estudiadas. Todos los genes seleccionados estuvieron relacionados con la degradación de la pared celular, lo que indica que este proceso es clave en la maduración del fruto. También, observaron un incremento de expresión del gen *FaExp2* (expansina-2) y *FaPG* (poligalacturonasa), ambos implicados en el reblandecimiento del fruto a través de la degradación de la pared celular, y de *Faccr* (cinamoil CoA-reductasa) y *Facad* (cinamil alcohol deshidrogenasa), que codifican enzimas que participan en la biosíntesis de la lignina. Así, dos clones diferentes de *Faccr* incrementaron su expresión más de 20 veces en frutos blandos (variedad “Gorella”), mientras que los niveles de expresión del gen *Facad* fueron tan sólo 2 ó 3 veces más elevados en variedades firmes

(variedad “Holiday”). CCR y CAD catalizan etapas sucesivas en la ruta de biosíntesis de la lignina y sus diferencias de expresión podrían dar lugar a diferencias en la composición de lignina en ambos cultivares. Dado que la lignina es un componente básico del tejido vascular (Aharoni *et al.*, 2002b) y que éste se asocia con la textura del fruto (Jewell *et al.*, 1973), diferencias en el contenido y la composición de la lignina pueden ser importantes para determinar el grado de firmeza del fruto. Por lo tanto, se considera que los genes *Facad* y *Faccr* participan en el control de la firmeza del fruto de fresa (Aharoni *et al.*, 2002b). Recientemente, ha sido caracterizada una peroxidasa, FaPOD27, como una enzima clave en la biosíntesis de lignina y que podría usarse como herramienta biotecnológica en la mejora de la firmeza de las fresas (Yeh *et al.*, 2014).

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

Por otra parte, el fruto de fresa genera cantidades muy pequeñas de etileno debido a la baja concentración de ACC sintasa que presenta (Perkins-Veazie *et al.*, 1995; Perkins-Veazie *et al.*, 1996). Además, se ha observado que la aplicación exógena de etileno no acelera la maduración del fruto ni induce la producción autocatalítica de esta hormona, salvo aplicada a grandes dosis, ya que en tal caso es capaz de incrementar ligeramente la tasa respiratoria del fruto (Janes *et al.*, 1978; Sas *et al.*, 1992; Villareal *et al.*, 2009). Aunque la aplicación de etileno sobre frutos de fresa no tiene un efecto obvio en la maduración, si tiene efecto sobre la expresión de un conjunto de genes relacionados con dicho proceso (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009). El etileno provoca la represión de la expresión de los genes  $\beta$ -galactosidasa, pectin metilesterasa y  $\beta$ -xilosidasa, implicados en el reblandecimiento del fruto



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

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

#### **4.2. Cambios microscópicos**

Durante el desarrollo del fruto de fresa y tras la caída de los pétalos, se produce un crecimiento inicial del receptáculo que se debe a una combinación de división y expansión celular (Knee *et al.*, 1977). La extensión celular aparece acompañada de importantes cambios en la pared celular y en las estructuras subcelulares. Así, en el momento de la caída de los pétalos, las células del receptáculo poseen paredes celulares densas y vacuolas pequeñas, los plastos contienen granos de almidón, y tanto el complejo de Golgi como los ribosomas son abundantes. Por el contrario, durante el desarrollo, las paredes celulares se engrosan, existe una mayor difusión a través de ellas, y el almidón cloroplastidial es hidrolizado completamente, probablemente para ser utilizado como sustrato metabólico durante las fases de proliferación y elongación celular (Knee *et al.*, 1977). Seguidamente, durante la etapa de maduración, los plastos llegan a degenerar, lo que podría considerarse una característica propia de la senescencia; sin embargo, los cloroplastos no se transforman en cromoplastos (Knee *et al.*, 1977) y las mitocondrias permanecen perfectamente normales en los frutos maduros. El proceso de maduración también

se caracteriza por la creciente hidratación y desorganización de la pared celular, así como por la mayor solubilidad de la lamela media y de la matriz de la pared celular, lo que provoca el reblandecimiento del fruto (Knee *et al.*, 1977).

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

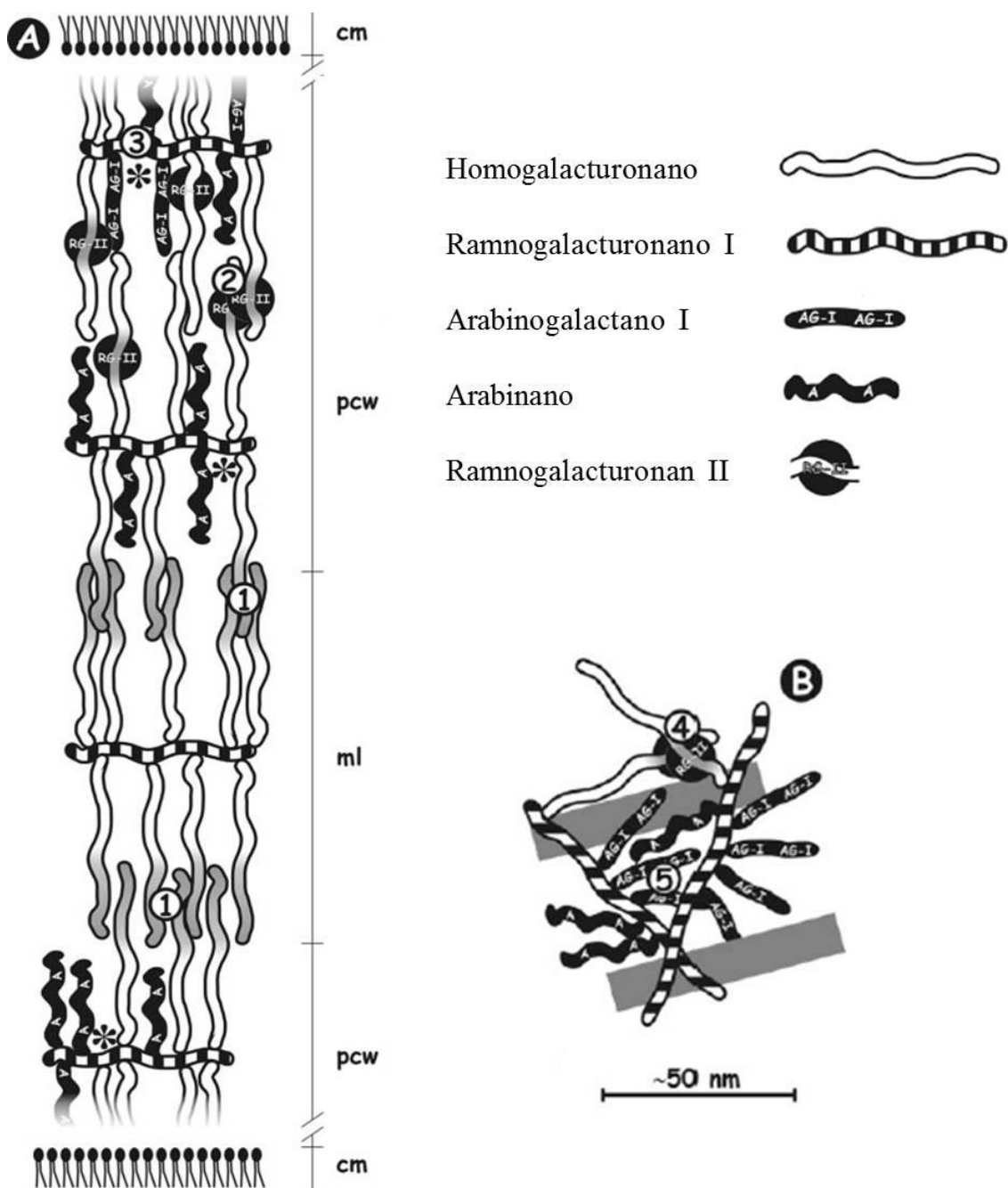
Se pueden distinguir tres tipos de pectina en las paredes celulares de las plantas: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RG-I), y ramnogalacturonanos II (RG-II) (Figura 6). En la lámina media de la pared celular, los HGA, una cadena principal lineal de 1,4-ligado ácido galacturónico, son predominantes (Vincken *et al.*, 2003). Los HGA contienen grupos heteropoliméricos de cuatro cadenas laterales de una longitud constante. Estas cadenas laterales y los residuos a los que están conectados se conocen como RG-II (Vincken *et al.*, 2003). Los RG-I están compuestos de una columna vertebral que alterna residuos de ácido galacturónico y ramnosa con un 20-80 % de residuos de ramnosa sustituidos por cadenas laterales de azúcares neutros. Las pectinas se representan típicamente como una cadena extendida de RG-I (regiones peludas) y los residuos de ramnosa aislados interespaciando las regiones de HGA lisas (Mercado *et al.*, 2011). Sin embargo, Vincken *et al.* (2003) propusieron un modelo alternativo en el que las regiones HGA son cadenas de RG-I laterales. En este modelo, los RG-I jugarían un importante papel estructural en la pared celular y su hidrólisis enzimática podría tener efectos dramáticos en la cohesión de la red de pectina.

#### **4.2.1. Cambios organolépticos: desarrollo del olor y sabor**

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

#### ***Carbohidratos***

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



**Figura 6: 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.

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

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

El almidón, principal hidrato de carbono de reserva en plantas, se sintetiza a partir de glucosa en una reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). Park y Kim (2007)

aislaron las secuencias de las subunidades mayores (*FagpL1* y *FagpL2*) y pequeña (*FagpS*) de la AGPasa. Comprobaron que la expresión de *FagpL1* y *FagpS* fue elevada y constante durante todo el desarrollo del fruto, mientras que *FagpL2* se expresa débilmente sólo en hojas, lo que sugiere un control de la expresión de los genes de la AGPasa tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Con el fin de modificar el azúcar contenido en la fresa, Park *et al.* (2006) silenciaron mediante antisentido la expresión de *FagpS* y consiguieron disminuir el contenido de almidón y aumentar el contenido de sólidos solubles en las plantas transgénicas generadas. En otro trabajo reciente, se ha analizado la actividad de cinco enzimas claves (la invertasa ácida soluble (IASI), la sacarosa sintasa (SS), la sacarosa fosfato sintasa (SPS), la hexoquinasa (HK) y la fructoquinasa (FK) en la biosíntesis de azúcar durante la maduración de frutas, destacando diferentes patrones en la actividad enzimática y en la acumulación de azúcar (Xie *et al.*, 2007). Por otra parte, Duangrisai *et al.* (2007) llevaron a cabo la clonación y el análisis de la expresión de los genes sorbitol deshidrogenasa NAD-dependiente (*FaSDH*) y sorbitol deshidrogenasa-6-fosfato (*FaS6PDH*) implicados en el metabolismo del sorbitol en fresa. Los niveles de transcripción de ambos genes fueron cuantificados en fruto y hojas, detectándose sólo actividad enzimática correspondiente a la enzima FaSDH en ambos tejidos.

### **Ácidos orgánicos**

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

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

receptáculo de fruto de fresa en diversos cultivares (Kafkas *et al.*, 2007; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). En líneas generales, el contenido de ácido cítrico presenta un patrón descendente mientras que el contenido de ácido málico no presenta una correlación clara con el proceso de maduración. Sin embargo, el contenido de ácido ascórbico aumenta a lo largo de la maduración, considerando a la fresa como un fruto rico en vitamina C. Este hecho le otorga a la fresa un gran potencial sobre los efectos beneficios en la nutrición y salud humana (Ornelas-Paz *et al.*, 2013). No obstante, esta capacidad antioxidante es muy dependiente del cultivar y del tiempo de recogida del fruto (Pincemail *et al.*, 2012).

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

### ***Compuestos fenólicos***

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

Los ácidos fenólicos proporcionan acidez al fruto y derivan de la fenilalanina por la vía de los ácidos cumárico y cinámico. Los taninos son los responsables de la astringencia del fruto como consecuencia de su interacción con las proteínas y mucopolisacáridos de la saliva (Ozawa *et al.*, 1987; Ferrer, 1997), y las flavonas dan lugar al amargor característico de los estadios verdes de

desarrollo. En general, todos estos compuestos están almacenados en las vacuolas y su concentración varía durante la maduración dependiendo de la variedad y condiciones ambientales de la planta (Hobson, 1993). De hecho, se ha propuesto que la pérdida de astringencia que se produce durante la maduración puede deberse a la interacción de las pectinas solubilizadas con los polifenoles, lo que evitaría que éstos se unieran a las proteínas salivares (Ozawa *et al.*, 1987).

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

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

### ***Compuestos volátiles***

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

El aroma del fruto de fresa es extremadamente conocido, no sólo como una característica del fruto fresco, sino que también es utilizado como aditivo de otros productos (Hancock, 1999). La

abundancia relativa de cada uno de los componentes volátiles es una “huella dactilar” de cada cultivar y especie, lo que ha sido motivo de numerosas investigaciones (Douillard y Guichard, 1990; Larsen y Poll, 1992; Larsen *et al.*, 1992). Las especies silvestres *F. vesca* y *F. virginiana* tienen un aroma mucho más fuerte que las variedades cultivadas (Hirvi y Honkanen, 1982). *F. vesca* contiene grandes cantidades de acetato de etilo, pero pequeñas cantidades de metil-butirato, etil-butirato y furanona. *Fragaria nilgerrensis* contiene altos niveles de etil-acetato y furanona, pero niveles bajos de metil-butirato y etil-butirato. Los híbridos entre *F. vesca* y *F. × ananassa* tienen niveles intermedios de fragancia y aroma, mientras que los cruces entre *F. nilgerrensis* y *F. × ananassa* se parecen más a los de *F. nilgerrensis*. Aunque cada uno de estos compuestos difiere en sus propiedades organolépticas, probablemente sólo un pequeño número de ellos contribuyen de manera significativa en el aroma. De hecho, la aplicación del concepto de “valor aromático” u olor umbral, que refleja la concentración necesaria para producir olor, indica que únicamente 15 de estos compuestos participan significativamente en el olor característico de la fresa (Shieberle y Hofmann, 1997). Varios estudios en fresa silvestre han identificado que algunos de los componentes clave del aroma de fresa, incluyendo acetatos de alcoholes de hidroxicinamoil y fenilpropenos, como el eugenol e isoeugenol, son derivados de fenilpropanoides (Pyysalo *et al.*, 1979; Ulrich *et al.*, 1995, 2007). La producción de eugenol en frutos de fresa maduros ha sido descrita y cuantificada como superior en fresas de la especie diploide silvestre *Fragaria vesca* frente a las especies domesticadas de *Fragaria × ananassa* (Pyssalo *et al.*, 1979; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). Por el contrario, la biosíntesis de isoeugenol es extremadamente baja en comparación con los niveles de eugenol (Hoffmann *et al.*, 2011). Recientemente, se han descrito dos enzimas eugenol sintasas (FaEGS1 y FaEGS2) que pueden usar como sustrato en una reacción *in vitro* coniferil acetato para dar lugar eugenol, cuyos genes presentan un patrón de expresión íntimamente correlacionado con con el contenido de eugenol tanto en aquenios (*FaEGS1*) como en receptáculo (*FaEGS2*) (Aragüez *et al.*, 2013).

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



maduración, alcanzando su valor máximo de actividad en frutos completamente maduros (Pérez *et al.*, 1996). La expresión del gen comienza en el estadio blanco del fruto, antes de la formación de ésteres volátiles detectables por cromatografía, y continúa aumentando en el estadio intermedio hasta alcanzar su máximo de expresión en el estadio rojo, lo que coincide con los niveles mayores de ésteres volátiles presentes en el fruto (Aharoni *et al.*, 2000). La enzima SAAT utiliza preferentemente alcoholes alifáticos de cadena media en combinación con diferentes acil-CoA como sustrato, de hecho su actividad resultó insignificante con alcoholes aromáticos y monoterpénol linalol como sustratos. En *Fragaria vesca* se ha aislado e identificado una proteína AAT (VAAT) (Beekwilder *et al.*, 2004) cuya expresión heteróloga muestra una actividad muy distinta a la SAAT. De hecho, VAAT es mucho más activa cuando utiliza como sustrato alcoholes de cadena corta, al contrario que la SAAT. En general, todos los datos disponibles sugieren que los volátiles presentes en cada especie están determinados en gran medida por el suministro de precursores.

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

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

Otros compuestos que parecen intervenir en el aroma de la fresa son los terpenoides. Estos compuestos derivan de la vía del mevalonato y/o de la vía plastidial 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Ambas rutas producen compuestos de 5 C que pueden ser empleados por prenil transferasas en reacciones de condensación para producir geranilo difosfato (PIB), precursor de los monoterpénos, y farnesil difosfato (FDP), precursor de diterpenos y de carotenoides. El linalool, nerolidol,  $\alpha$ -pineno y limoneno son terpenos volátiles predominantes en la fresa que pueden suponer hasta un 20 % de los volátiles totales del fruto (Loughrin y Kasperbauer, 2002).

Recientemente, se ha clonado y expresado una nerolidol sintasa (NES1) que genera como productos mono y sesquiterpenos (Aharoni *et al.*, 2004). La enzima recombinante FaNES1 forma (S)-linalol y trans-(S)-nerolidol del PIB y del FDP respectivamente. Este gen se expresa de forma específica y fuertemente en frutos de variedades cultivadas (octoploides) pero no en las silvestres, por lo que el linalool y nerolidol participan únicamente en la composición final del aroma del fruto de las variedades de fresa cultivadas (Aharoni *et al.*, 2004).

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

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

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

El elevado número de compuestos relacionados con el aroma en el fruto de fresa sugiere que las enzimas involucradas podrían ser multifuncionales, lo que evitaría un gasto extra de energía

para la síntesis de proteínas nuevas. No obstante, esto también podría ser un reflejo de la falta de especificidad de enzimas como reductasas, esterasas, oxidasas, etc., implicadas en la producción de numerosos compuestos involucrados en el aroma del fruto.

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

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

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

A lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto de fresa, se observa una transición desde el color verde inicial al color rojo propio de frutos completamente maduros. Este cambio de coloración se debe tanto a la degradación de clorofilas como a la síntesis *de novo* de antocianinas responsables de la coloración de los frutos maduros y localizadas en las vacuolas (Timberlake, 1981; Perkin-Veazie, 1995). La biosíntesis de antocianinas comienza en el fruto blanco (Woodward, 1972) y se produce a partir de fenilpropanoides y de flavonoides por la vía del ácido siquímico (Harbone, 1973). Mediante la unión de azúcares en diferentes posiciones a

la molécula de antocianina se sintetizan los antocianos que, además, pueden acetilarse con distintos ácidos fenólicos para dar lugar a diferentes pigmentos. Así, en un fenómeno denominado co-pigmentación, las antocianinas forman complejos con las flavononas produciendo un efecto crómico que cubre el rango desde el rojo al azul (Asen *et al.*, 1972). La antocianina predominante en fresa es la pelargonidina-3-glucósido (Wrolstad *et al.*, 1970; Green, 1971; Kalt *et al.*, 1993), que constituye el 88 % de las antocianinas presentes en el fruto, aunque también se han detectado pelargonidina-glucósido y cianindina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995). La concentración total de antocianinas varía unas 16 veces en los diferentes cultivares, observándose también una cierta variación en su composición (Bakker *et al.*, 1994). Recientemente, todos estos metabolitos secundarios han adquirido mucha importancia debido a su capacidad de prevenir y proteger de enfermedades degenerativas, cardiovasculares, cáncer, diabetes de tipo II y obesidad (Hannum, 2004; Seeram, 2008; Giampieri *et al.*, 2015).

Los fenilpropanoides se sintetizan a partir de fenilalanina por la acción secuencial de la fenilalanina amonio-liasa (PAL), la ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H) y la *p*-cumarato:CoA ligasa (4CL). Estos compuestos actúan como sustratos en la síntesis de flavonoides y/o precursores de la lignina (Figura 7). En etapas tempranas de maduración, la actividad PAL también se ha asociado con la síntesis de proantocianidinas (PA) (Cheng y Breen, 1991). La acumulación de pigmentos de antocianina es uno de los rasgos más importantes que convierte a la fresa en un producto atractivo para el consumidor. Existen cultivares donde la acumulación de antocianinas es un rasgo potenciado y se presenta asociado a una mayor expresión del gen *FaPAL6* (Pombo *et al.*, 2011). Corriente abajo en la ruta, aparece un grupo de enzimas multifuncionales involucradas en la biosíntesis de los fenilpropanoides y que corresponde a la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y la cumarílico CoA reductasa (CCR), implicadas ambas en la biosíntesis de monolignoles y en la lignificación del sistema vascular, lo que repercute directamente en la firmeza de la fruta (Anterola *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2002). Otros compuestos descritos recientemente en frutos de fresa han sido los isómeros *cis* y *trans*-resveratrol (estilbenos) (Wang *et al.*, 2007). Se ha comprobado que se acumulan preferentemente en receptáculo y que sus niveles podrían verse afectados tanto por el genotipo como por las condiciones ambientales (Wang *et al.*, 2007).

Los niveles y la composición cualitativa de los flavonoides en frutos de fresa dependen de factores genéticos, ambientales y de desarrollo, así como de la manipulación que sufren los frutos tras su recogida, así como de la temperatura y calidad del aire durante su almacenamiento postcosecha (Bakker *et al.*, 1994; Häkkinen y Törrönen, 2000; Wang y Lin, 2000; Anttonen *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2007; Tulipani *et al.*, 2008; Dragišić Maksimović *et al.*, 2015). Debido al cambio de color asociado a la biosíntesis de antocianinas, la vía de los flavonoides se utiliza

para estudios funcionales en receptáculo de fruto de fresa. Así, entre los 10-12 días después de la antesis, se observa un primer pico de expresión y actividad enzimática asociado a la síntesis de compuestos derivados del flavan-3-ol y, unos 15-20 días más tarde, se aprecia un segundo pico de expresión que está relacionado con el incremento de la síntesis de antocianos en frutos completamente desarrollados, principalmente pelargonidina-3-glucósido (Perkins-Veazie, 1995).

Las primeras reacciones de la ruta de biosíntesis de flavonoides son catalizadas por la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Figura 7). Debido a su posición clave en el inicio de la ruta, la CHS ha sido objeto de un amplio estudio en el fruto de fresa. Así, se ha comprobado que la inhibición de la expresión de la FaCHS bloquea la biosíntesis de flavonoides. Además, plantas con la expresión de *FaCHS* silenciada muestran niveles reducidos de antocianinas y de flavonoides, lo que indica un papel clave de esta enzima en la biosíntesis de estos compuestos (Lunkenbein *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito un incremento de la actividad de otras enzimas implicadas en la biosíntesis de antocianinas tales como la dihidroflavonol reductasa (DFR) (Moyano *et al.*, 1998; Hirner *et al.*, 2001; Miosic *et al.*, 2014), la O-metil transferasa (OMT) (Lunkenbein *et al.*, 2006), la flavonoide 3-hidroxilasa (F3H) o la chalcona reductasa (CHR) (Manning, 1998). La expresión de estos genes está regulada negativamente por la acción de las auxinas (Wilkinson *et al.*, 1995; Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998). Además, los genes correspondientes a la CHS, la F3H y la DFR presentan niveles elevados de expresión en los estadios verdes inmaduros (Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998), lo que sugiere una implicación adicional de los mismos en el metabolismo de otros compuestos fenólicos, como por ejemplo los taninos.

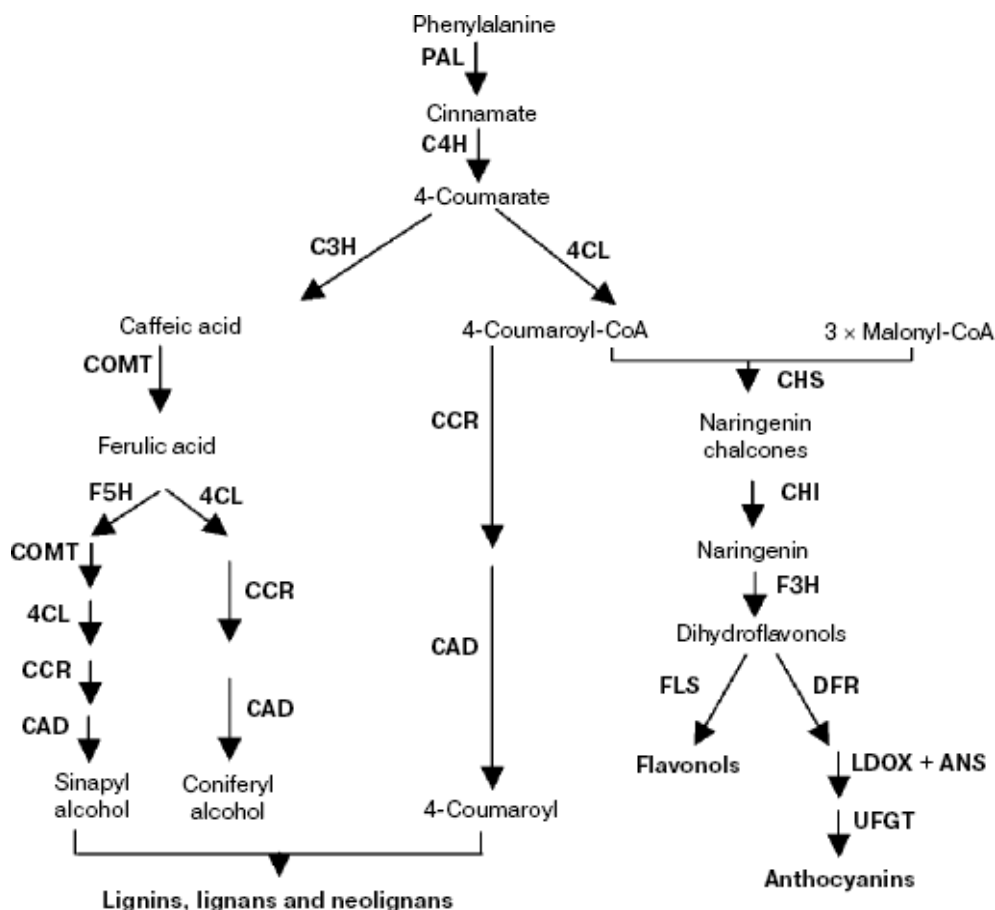
Por otro lado, estudios recientes han demostrado que el calcio puede aumentar la acumulación de antocianinas y fenoles totales en los receptáculos del fruto de fresa posiblemente a través de la regulación positiva de determinados genes estructurales de la ruta de biosíntesis de antocianinas, incluyendo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

Los genes *FaMYB1* y *FaMYB10* codifican dos factores de transcripción de tipo MYB ambos relacionados con la acumulación de antocianinas en el fruto de fresa durante la maduración (Aharoni *et al.*, 2001; Lin-Wang *et al.*, 2010; Salvatierra *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*,

2014). También, han sido descritos dos genes que codifican factores de transcripción de tipo MADS-box, *FaMADS9*, perteneciente al grupo *SEPALLATA* (Seymour *et al.*, 2011), y *FaSHP* (*SHATTERPROOF*) (Daminato *et al.*, 2013). Todos estos genes muestran un incremento de su expresión a lo largo del desarrollo y maduración del fruto de fresa, así como una clara regulación hormonal de su expresión, ya que se regulan negativamente por auxinas y positivamente por ABA. La sobreexpresión de *FaMYB1* en hojas de tabaco (Aharoni *et al.*, 2001) dio lugar a la supresión de antocianinas, sugiriendo que FaMYB1 actúa como represor de la transcripción y no como activador transcripcional. Por otra parte, el silenciamiento transitorio de *FaMYB10* en frutos de fresa mediante ARN interferente condujo a una reducción de la expresión de genes implicados en la producción de antocianinas y fenilpropanoides, así como del contenido de antocianinas en los mismos (Medina-Puche *et al.*, 2014). Además, la expresión de FaMYB10 no está regulada por FaMYB1 y viceversa (Medina-Puche *et al.*, 2014). En conjunto, estos datos indican que *FaMYB10* juega un papel regulador general en la ruta de los flavonoides/fenilpropanoides durante la maduración de la fresa. Por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento de *FaMADS9* también provocó una reducción en el contenido de antocianinas totales en el fruto de fresa maduro (Seymour *et al.*, 2011) y el silenciamiento de *FaSHP* produjo una reducción en los niveles de expresión del gen marcador *FaCHS* y de los genes *FaMYB1*, *FaMYB10* y *FaMADS9*, provocando un retraso en la coloración del fruto, así como una reducción en la expresión de otros genes marcadores implicados en otras rutas tales como *FaPG1*, *FaPL*, *FaEG1*, *FaPAL6* y *FaQR*. Recientemente, se ha identificado otro FT de tipo MYB, FaGAMYB, que desempeña un importante papel regulador en el inicio de la maduración del receptáculo del fruto de fresa, actuando corriente arriba del ABA (Vallarino *et al.*, 2015). El silenciamiento transitorio de *FaGAMYB* provocó una detención en la maduración del fruto e inhibió la aparición del color rojo característico del fruto de fresa. En consonancia con este efecto, varios FTs asociados con la ruta de biosíntesis de flavonoides mostraron su expresión alterada y además se cuantificó una reducción de la biosíntesis de ABA y del contenido de sacarosa (Vallarino *et al.*, 2015). Curiosamente, la aplicación exógena de ABA rescató este fenotipo (Vallarino *et al.*, 2015).

Además, se han identificado en fresa otros TFs relacionados con la biosíntesis de flavonoides: tres de la familia de genes *myb*, cuatro de la familia del gen *myc* (bHLH) y un factor de transcripción WD-40 (Baudry *et al.*, 2004). Estos genes son homólogos a otros TFs implicados en la biosíntesis de flavonoides en otras especies y muestran un patrón de expresión paralelo a la acumulación de flavonoides durante el desarrollo del fruto de fresa (Baudry *et al.*, 2004). En *Arabidopsis thaliana* la expresión de los genes de biosíntesis de proantocianidinas es inducida específicamente por un complejo de proteínas ternario, compuesto de AtTT2 (AtMYB123), AtTT8 (AtbHLH042) y AtTTG1 (proteína WD40). Se empleó una aproximación metodológica

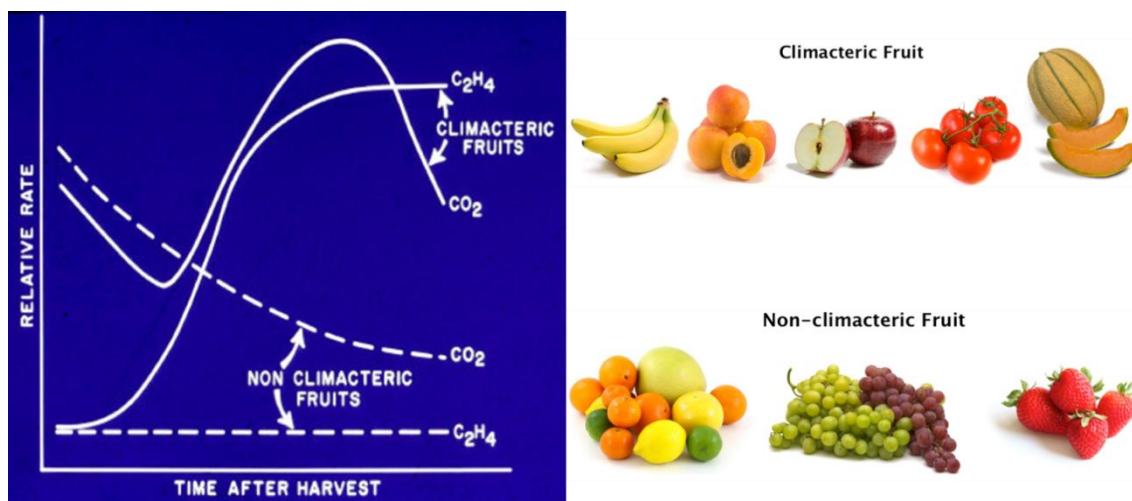
que combinaba doble híbrido de levadura con aglomeración y agrupación jerárquica de datos de transcriptómica y metabolómica para identificar reguladores de proantocianidinas en fresa. Entre los genes candidatos aislados, cuatro eran similares a *AtTT2*, *AtTT8* y *AtTTG1* (*FaMYB9* / *FaMYB11*, *FabHLH3* y *FaTTG1*, respectivamente) y dos codifican putativos reguladores negativos (*FaMYB5* y *FabHLH3Δ*) (Schaart *et al.*, 2013). Además, *FaMYB9*/*FaMYB11*, *FabHLH3* y *FaTTG1* eran capaces de complementar los mutantes testa transparentes *tt2-1*, *tt8-3* y *ttg1-1*, respectivamente, así como de *trans*-activar el promotor de la antocianidina reductasa de *Arabidopsis* (Schaart *et al.*, 2013). Pillet *et al.* (2015) usando el análisis de redes de co-expresión del transcriptoma (TCNA; transcriptome co-expression network analysis) acoplado a ensayos de expresión transitoria en frutos de fresa, han identificado nuevos FTs candidatos (*FaTCP11*, *PCL1-like* and *FaSCL8*) reguladores de nodos específicos de la vía de flavonoides. Estos hallazgos proporcionan nuevas herramientas para modificar el contenido de proantocianidinas y la calidad del fruto de fresa y a su vez este enfoque podría proporcionar una solución técnica para dilucidar rutas de interés no tan bien caracterizadas hasta el momento.



**Figura 7: Diagrama de las rutas de biosíntesis comprometidas con el metabolismo de los fenilpropanoides.** (Extraído de Du *et al.*, 2009).

### 4.3. Respiración

Los frutos se clasifican en climatéricos y no-climatéricos, dependiendo del modelo de respiración que presentan durante su proceso de maduración (Figura 8).



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

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



Por definición, los frutos no-climatéricos no presentan un pico en los niveles de etileno o en la respiración durante la maduración del fruto (Seymour *et al.*, 1993) (Figura 8), aunque se han obtenido evidencias de un incremento transitorio en los niveles endógenos de etileno antes del envero de la uva por lo que no se puede descartar que el etileno juegue un papel durante el desarrollo de las bayas de uva (Chervin *et al.*, 2004). No obstante, en frutos no-climatéricos, todos los cambios asociados a la maduración del fruto suceden sin que se detecte un incremento significativo de la producción de etileno, lo que parece indicar que este proceso es independiente de dicha hormona (Villareal *et al.*, 2009).

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

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

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

#### **4.4. Choque oxidativo**

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

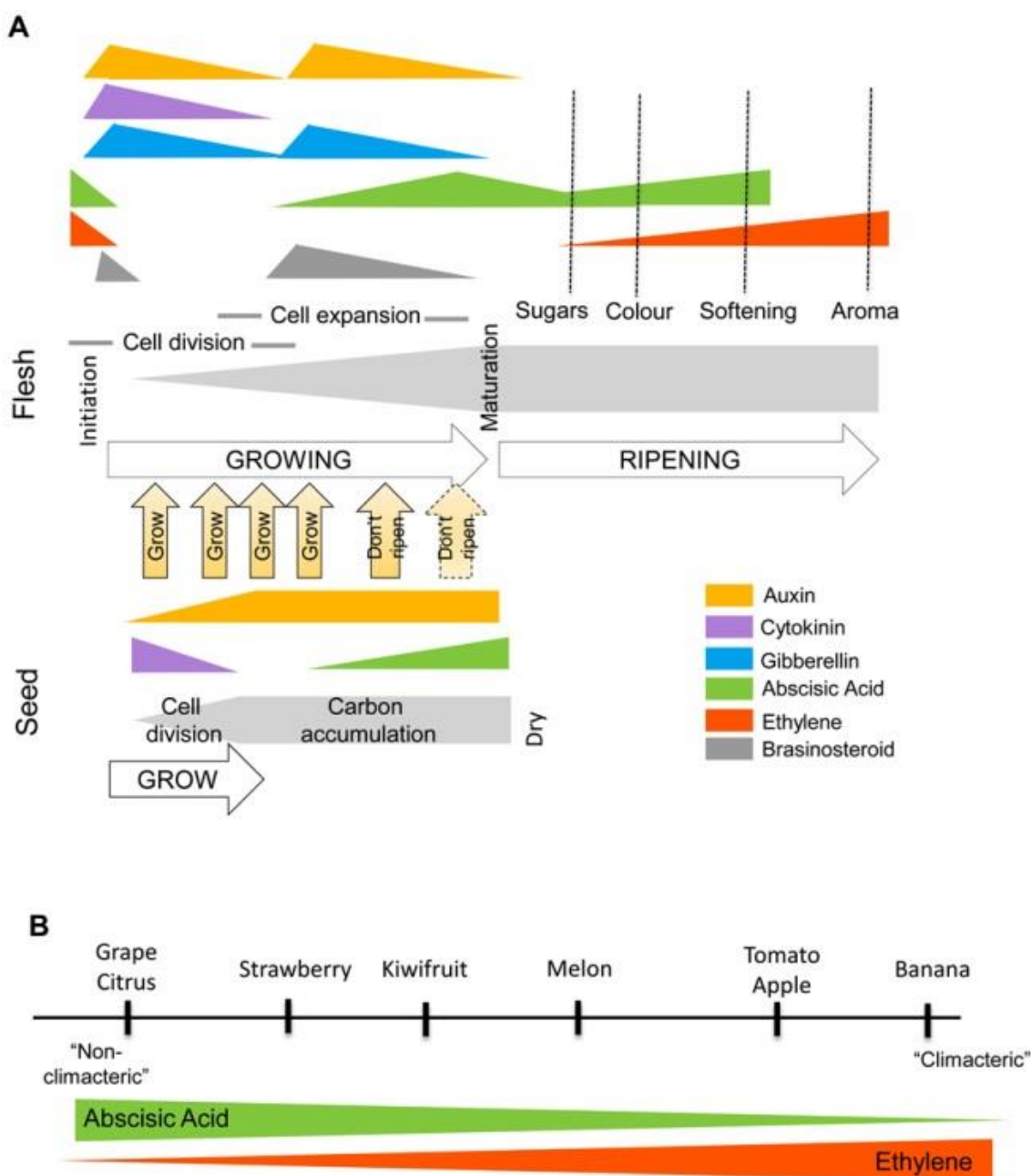
En tomate, se ha observado que durante su proceso de maduración y, concretamente en el estadio blanco-intermedio, se incrementan los índices indicativos de procesos oxidativos como el contenido en peróxido de hidrógeno, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Jiménez *et al.*, 2002). En otros frutos, como pera y piña, se ha descrito durante la maduración un incremento del nivel de transcrito correspondiente a un gran número de genes que codifican proteínas antioxidantes y enzimas de la ruta de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que apoya la hipótesis de que durante este proceso se produce un fenómeno oxidativo que requiere un equilibrio entre la producción y eliminación de ROS por los sistemas antioxidantes (Fonseca *et al.*, 2004; Moyle *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha observado ninguna modificación en los niveles de transcrito de genes involucrados en estrés oxidativo durante la maduración del fruto de la uva (Terrier *et al.*, 2005). En fresa, se ha observado un incremento de la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) a lo largo del proceso de maduración del fruto (López-Ráez *et al.*, 2003). Posteriormente, una UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase (FaGT2) fue identificada y caracterizada como un enzima multifuncional implicada en el metabolismo de compuestos naturales y xenobióticos en *F. ananassa* (Landmann *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo sugieren que FaGT2 participa en la detoxificación de compuestos xenobióticos de acuerdo con la inducción de la expresión del gen *FaGT2* bajo condiciones de estrés oxidativo (Landmann *et al.*, 2007). Además, la expresión del gen *FaGAST2* también aumentó en condiciones de estrés oxidativo (bajo tratamientos con  $H_2O_2$  o tras la infección con *Colletotrichum acutatum*), lo que sugiere un papel directo para la proteína FaGAST2 en la eliminación de especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento y maduración del fruto y durante la infección fúngica (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

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

A lo largo del desarrollo y maduración de los frutos se producen cambios en las concentraciones de hormonas en los mismos (Figura 9). Las variaciones en las concentraciones hormonales en las semillas y sus tejidos circundantes son las que determinan el programa de desarrollo y maduración del fruto. Múltiples estudios han demostrado que durante la formación del fruto se incrementa el contenido de auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides, y que auxinas, giberelinas y brasinoesteroides intervienen en el crecimiento del fruto. Para desencadenar la maduración del fruto se produce una inhibición del transporte de auxinas desde las semillas y un incremento de ABA. Esto dispara el programa de maduración y senescencia que conduce a un incremento de ABA y/o etileno y su respuesta en tejidos circundantes. Todos los frutos parecen que responden a ABA y etileno. Históricamente se consideran frutos climatéricos aquellos cuya maduración es regulada por ABA indirectamente a través del etileno. En frutos no climatéricos,

el ABA juega un papel más dominante pero mantienen caracteres de la maduración dependientes del etileno (McAtee *et al.*, 2013; y referencias en él contenidas).

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



**Figura 9: A. Cambios hormonales que suceden en un fruto genérico durante el desarrollo y maduración. B. Espectro de dependencias al ABA y al etileno en la maduración.** (Extraído de McAtee *et al.*, 2013).

## 5.1. Auxinas

Durante la etapa de desarrollo del fruto, en los achenios tiene lugar la síntesis de la auxina ácido 3-indol acético (IAA), que es exportada al receptáculo (Nitsch, 1950). El análisis de los niveles de IAA en el fruto de fresa constató que el IAA libre, considerado como la forma activa de la hormona, es la forma predominante en achenios y presenta un nivel máximo de 3 µg/g de peso seco a los diez días post-antesis (Dreher y Poovaiah, 1982). De esta cantidad, menos del 1 % está presente en el receptáculo en el mismo estadio de desarrollo. Además, se ha encontrado que el IAA conjugado por enlaces tipo amida es la principal forma de IAA presente en el receptáculo. No obstante, otros estudios han encontrado en el tejido del receptáculo niveles sustancialmente mayores de IAA libre y conjugado que los descritos por Dreher y Poovaiah (1982) (Archbold y Dennis, 1984; Park *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que los niveles de IAA unido por enlace tipo amida presentan una distribución bimodal con un pico de concentración en el receptáculo a los 11 días seguido de un descenso y una posterior acumulación en los últimos estadios de maduración del fruto (Archbold y Dennis, 1984).

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

Las auxinas pueden inhibir la maduración en muchos frutos no-climatéricos (Trainotti *et al.*, 2005). En fresa, Given *et al.* (1988b) propusieron que las auxinas producidas por los achenios inhiben la maduración en los frutos en estadio verde. A medida que el fruto se desarrolla, el nivel de las auxinas en los achenios va declinando, lo que implica que en el receptáculo se produce un descenso en la concentración de IAA hasta un nivel crítico que permite que se desencadene el proceso de maduración (Manning, 1993; Symons *et al.*, 2012). Por lo tanto, las auxinas estimularían la elongación del fruto mientras que reprimirían la maduración del mismo. De este modo, al retirar los achenios de la superficie promovemos la maduración, mientras que

tratamientos con auxinas sintéticas dan resultados opuestos (Given *et al.*, 1993; Manning, 1993). En uva, también se ha descrito que las auxinas actúan como inhibidores de la maduración. En este caso el tratamiento con ácido benzotiazol-2-oxiacético, una auxina sintética, retrasó tanto el proceso de maduración como el incremento de los niveles de ABA endógenos asociado a dicho proceso (Davies *et al.*, 1997), sugiriendo que auxinas y ABA pueden interactuar para controlar la maduración.

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

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

## 5.2. Giberelinas y citoquininas

Aunque las auxinas son las hormonas que dominan el proceso de crecimiento y desarrollo de la fresa, sus efectos pueden ser modificados por otras fitohormonas presentes también en el fruto (Lis *et al.*, 1978). Las giberelinas (GAs) son compuestos tetracíclicos diterpenoides implicados en la regulación de muchos procesos del desarrollo que tienen lugar durante el ciclo de vida de la planta, tales como germinación de semillas, división celular y elongación, inducción floral y desarrollo y crecimiento del fruto (Pharis y King, 1985; Serrani *et al.*, 2007). Más de 100 GAs diferentes han sido identificadas en plantas; sin embargo, sólo unas pocas de ellas son biológicamente activas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>) (Olszewski *et al.*, 2002).

La 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), sin embargo, se ha comprobado que actúa de forma sinérgica con la 1-naftalenacetamida (1-NAAM) en frutos intactos cultivados *in vitro* promoviendo su crecimiento y maduración (Kano y Asahira, 1978). También se ha demostrado que la citoquinina N6-benciladenina (BA) suprime el crecimiento y maduración en conjunción con 1-NAAM. La actividad máxima de citoquininas y giberelinas ha sido detectada 7 días después de la antesis, concentrándose principalmente en 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). Por otro lado, se ha comprobado que la kinetina no induce crecimiento en tejidos cultivados de fresa, ni aplicada a frutos intactos (Lis y Antoszewski, 1979). Por lo tanto, las auxinas son las hormonas que dominan el proceso de crecimiento y desarrollo, aunque dichos efectos pueden ser modificados por otras sustancias presentes también en el fruto.

La aplicación de GA<sub>3</sub> a frutos maduros provoca un significativo retraso en el desarrollo del color rojo característico de los frutos de fresa, probablemente como resultado de un retraso en el incremento de expresión de PAL, clorofilasa y actividades peroxidasas (Martínez *et al.*, 1996). Recientemente, se ha demostrado que tras la aplicación en frutos de fresa de GA<sub>3</sub> exógena se incrementó la expresión de varios genes, como *FaGAST* que codifica para una proteína implicada en la elongación celular y el tamaño final del fruto (de la Fuente *et al.*, 2006) y *FaXyl* que codifica para una  $\beta$ -xilosidasa (Bustamante *et al.*, 2009). Hytönen *et al.* (2009) han propuesto que las GAs podrían controlar la inducción de la división celular en los tejidos subapicales de las yemas axilares y actuar como una señal para determinar el destino del brote. Además, también han observado que las GAs parecen intervenir en la diferenciación de las yemas axilares regulada por el fotoperíodo. Por otra parte, recientemente también se ha sugerido

un papel importante de las GAs en el desarrollo del receptáculo del fruto de fresa, detectando niveles extremadamente altos de GA<sub>4</sub> (Csukasi *et al.*, 2011).

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

### 5.3. Ácido abscísico

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

Por otra parte, el ABA también parece estar involucrado en el retraso del crecimiento detectado en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico a través de la restricción de la producción de etileno. Es muy probable que esta interacción hormonal sea relevante en otras respuestas a estreses de plantas en las que se encuentre envuelto el etileno (Sharp, 2002). Además, el ABA controla ciertas funciones fisiológicas o de desarrollo en situaciones normales de la planta. Así, se ha descrito que las plantas deficientes en ABA muestran un fenotipo anormal, incluso en condiciones de buen riego (Wasilewska *et al.*, 2008). Paralelamente, estudios recientes han revelado que esta hormona es también activa en respuesta a estreses bióticos dependientes de patógenos (Fan *et al.*, 2009; Lim and Lee, 2015). En fresa, se ha observado que el ABA se acumula tanto en achenios como en receptáculos a los 20 días postantesis (Archbold y Dennis, 1984). Este aumento es simultáneo al descenso del nivel de IAA en ambos tejidos, por ello se ha propuesto que la relación ABA/IAA podría ser suficiente para dirigir el cambio genético que ocurre durante la transición de elongación a maduración del fruto (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Además, se ha comprobado que la aplicación de ABA exógeno acelera la maduración en receptáculos cultivados *in vitro* (Kano y Asahira, 1981). No obstante, estos resultados obtenidos *in vitro* deben ser interpretados con precaución puesto que los frutos cortados no llegan a alcanzar el tamaño total y su crecimiento es mucho más lento que cuando se produce en la planta.

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

#### **5.4. Etileno**

En el fruto de fresa, la producción de etileno presenta un máximo en el estadio verde descendiendo su nivel hasta el día 20 tras la antesis. Dicho descenso se correlaciona con la transición del fruto de estadio verde al estadio blanco de maduración. A continuación, se



observa un nuevo aumento de su producción que alcanza su máximo en el estadio maduro (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Este descenso transitorio en la producción de etileno al comienzo del proceso de maduración del fruto podría deberse a la compartimentación del 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), precursor del etileno. No obstante, también podría ser debido a un descenso en las actividades ACC sintasa o ACC oxidasa (ACO), responsables ambas de la síntesis de esta fitohormona (Perkins-Veazie *et al.*, 1995). Recientemente, se ha descrito que el patrón de expresión del gen *FaACO1* coincide con la acumulación de esta fitohormona durante el proceso de maduración (Trainotti *et al.*, 2005). Por otra parte, aunque en frutos escindidos y tratados con ACC se incrementó la producción de etileno junto con el peso fresco y la acumulación de antocianinas, no se observó ningún cambio en la respiración (Perkins-Veazie *et al.*, 1996). Se ha descrito también que la aplicación exógena de etileno en frutos de fresa acelera su proceso de senescencia (El-Kazzaz *et al.*, 1983), mientras que el inhibidor de la percepción del etileno, el 1-metil ciclopropeno (1-MPC), mantiene la firmeza del fruto y reduce la acumulación de antocianinas y del contenido en compuestos fenólicos del fruto en postcosecha (Jiang *et al.*, 2001; Villareal *et al.*, 2010).

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

En fresa se ha observado que el etileno reprime la expresión de los genes que codifican una pectín metilesterasa (*FaPE1*) (Castillejo *et al.*, 2004), una galactosidasa (*FaEG3*) (Trainotti *et al.*, 2001; Balogh *et al.*, 2005) y una  $\beta$ -xilosidasa (*FaXyl1*) (Villareal *et al.*, 2010), mientras que no se modifica la expresión de otros genes también relacionados con la degradación de la pared celular como es el caso de los genes *FaExp2* y *FaCell*, que codifican una expansina y una celulasa respectivamente (Civello *et al.*, 1999). Además, se han clonado tres genes de fresa diferentes que codifican receptores de etileno (*FaETR1*, *FaETR2* y *FaERS1*) y cuya expresión es inducida por esta hormona de forma diferencial durante la maduración del fruto (Trainotti *et al.*, 2005), lo que podría indicar un posible papel del etileno en la maduración del fruto de fresa. Plantas transgénicas de fresa sobreexpresando el receptor de etileno *etr1-1* de *A. thaliana* mostraron una represión considerable de los niveles de los receptores de etileno *FaETR1*, *FaETR2* y *FaERS1*, lo que condujo a cambios en la sensibilidad al etileno (Merchante *et al.*, 2013). Adicionalmente, se observaron cambios en la expresión de algunos genes relacionados

con las pectinas en el receptáculo. En los receptáculos transgénicos se encontró inducida la expresión de *FaPEI* mientras que la de *FaPLA* fue reprimida. También disminuyó la expresión de *FaPG2* pero no la de *FaPG1*, indicando que el etileno no tiene un efecto general en todos los genes asociados al proceso de maduración. Esto explicaría por qué no se encuentra un efecto del etileno sobre la firmeza de los frutos (Merchante *et al.*, 2013). El programa metabólico asociado con la maduración de los receptáculos de fresa está también regulado por etileno. El descenso en la percepción del etileno causó una disminución del contenido de compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, incluyendo el ácido cítrico, succínico y málico en el estadio blanco. Esto lleva acompañado un aumento del contenido de algunos aminoácidos (serina, fenilalanina y alanina) y una disminución de los principales azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en el estadio rojo de frutos transgénicos (Merchante *et al.*, 2013). Aunque la producción de volátiles no ha sido evaluada en estas líneas transgénicas, sí se ha observado un descenso en la expresión del gen *FaOMT*, lo que apoya un cambio en la producción de mesifuranona. Se ha descrito que variaciones naturales en el contenido de mesifuranona están asociadas con la expresión del gen *FaOMT* (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). En general, los datos presentados en este trabajo indican que el etileno es necesario para el correcto desarrollo del fruto de fresa (Merchante *et al.*, 2013).

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

## 5.5. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son un grupo de hormonas vegetales esteroideas necesarios para el desarrollo normal de las plantas (Davies, 2004) cuyos niveles bioactivos incrementan dramáticamente al comienzo de la maduración de las uvas (Symons *et al.*, 2006). Tratamientos con BRs promovieron la maduración de la uva, mientras que la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de BRs retrasaron este proceso (Symons *et al.*, 2006). Estos resultados nos proporcionan claras evidencias de que cambios en los niveles endógenos de BRs tienen una fuerte influencia sobre los procesos de maduración en frutos no-climatéricos y plantea la cuestión de si los BRs pueden jugar un papel importante como hormona señal que desencadene los procesos de maduración en otros frutos no-climatéricos. En frutos climatéricos como el tomate, discos de pericarpio del mutante insensible a etileno, *Never ripe (Nr)*, fueron tratados con BRs provocando una acumulación significativa de carotenoides respecto a los controles (Liu *et al.*, 2014). Además, un gen mutante de *Arabidopsis bsr1-1D* dominante, *BZRI-1D*

(*Brassinazole resistant 1*), se sobreexpresó en tomate para evaluar el papel de BZR1 en el proceso de maduración de los frutos de tomate. Los frutos de las plantas de tomate transformadas mostraron un color verde oscuro durante el estadio verde maduro (MG), un aumento de la acumulación de carotenoides y el contenido de azúcares solubles y ácido ascórbico durante la maduración (Liu *et al.*, 2014). Estos resultados indican un uso potencial de BZR1 para la mejora de la calidad nutricional y del sabor del tomate mediante ingeniería genética.

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

## 6. Control de la floración

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

En oposición a las plantas de *F. vesca* de día corto y floración estacional, existen accesiones de floración perpetua (*F. vesca* f. *semperflorens*) que dan flores y frutos desde comienzos del verano hasta finales del otoño (Brown y Wareing, 1965). Se ha comprobado que tres accesiones de floración perpetua presentan respuestas medioambientales opuestas en comparación con las plantas de día corto. Dichas accesiones son plantas de día largo que florecen rápidamente bajo fotoperíodos largos y altas temperaturas, en contraposición a las plantas de día corto

quereprimen la floración bajo tales condiciones (Sønsteby y Heide, 2008; Mouhu *et al.*, 2009). Estudios genéticos clásicos demostraron que la floración perpetua es causada por los alelos recesivos de un único gen represor llamado *seasonal flowering locus* (*SFL*; Brown y Wareing, 1965; Albani *et al.*, 2004). Los cultivares de floración perpetua (a menudo llamados remontantes o “everbearing”) están también representados en la fresa cultivada. Estos cultivares han sido considerados como cultivares de día neutro o plantas de día largo dependientes de la temperatura (Sønsteby y Heide, 2007; Weebadde *et al.*, 2008; Bradford *et al.*, 2010; Stewart y Folta, 2010).

Por otra parte, durante la búsqueda de genes diferencialmente expresados en frutos de fresa, se identificó un ADNc correspondiente al gen *FaGAST1* (ácido giberélico de transcripción estimulada) (de la Fuente *et al.*, 2006). Este gen está altamente expresado en frutos en estadio blanco, rojo maduro y en raíces, donde su expresión se relaciona con el proceso de elongación de las células del extremo apical. Líneas transgénicas de *Fragaria vesca* sobre-expresando el gen *FaGAST1* mostraron un retraso en el crecimiento de la planta, tamaño reducido de los frutos, floración tardía y sensibilidad baja a giberelinas. Por ello, los genes *FaGAST* se han asociado con eventos como la división celular, la elongación celular y la floración (Wisemann y Turnbull, 1999).

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

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

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

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

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

membrana (Civello *et al.*, 1995), relacionadas con la producción de antocianinas (Given *et al.*, 1988a), y con el metabolismo de la sacarosa (Hubbard *et al.*, 1991) también aumentan su actividad durante el proceso de maduración de la fresa.

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

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

La reestructuración de la pared celular es una de las modificaciones más importantes que sufre el fruto durante su maduración y afecta, fundamentalmente, a su composición pectínica. En nuestro grupo, se han aislado y caracterizado varios genes que codifican pectato liasas (*pIA*, *pIB* and *pIC*) relacionadas con la pérdida de firmeza del fruto durante su proceso de maduración (Medina-Escobar *et al.*, 1997b; Benítez-Burraco *et al.*, 2003). De hecho, su silenciamiento en frutos transgénicos se tradujo en un incremento de la firmeza de éstos y en un retraso en su proceso de maduración (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Paralelamente, también han sido aislados y caracterizados varios genes que codifican endoglucanasas (*Cel2*) (Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Palomer *et al.*, 2006), (*FaEG3*) (Trainotti *et al.*, 1999), (*Cell*) (Harpster *et al.*, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001), una poligalacturonasa (*spG*) (Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Quesada *et al.*, 2009; García-Gago *et al.*, 2009) y una

xilosidasa (*FaXyl1*) (Lee *et al.*, 2003; Minic *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2006), cuyas características de expresión los relaciona directamente con la maduración de la fresa. También se han identificado en fresa siete expansinas (*FaEXP1* a *FaEXP7*) (Harrison *et al.*, 2001) que participan en el reblandecimiento de la pared celular utilizando para ello como sustrato al xiloglucano presente en ella. De las siete descritas, sólo dos de ellas son específicas de fruto y aumentan su expresión a lo largo de la maduración (*FaEXP2* y *FaEXP5*) (Harrison *et al.*, 2001). De hecho, se ha encontrado una correlación entre la *FaEXP2* y la *FaEXP5* y los niveles de expresión y firmeza del fruto. Así, estudios en diferentes variedades de fresa indican que ambas expansinas muestran una mayor expresión en las variedades más blandas (Toyonaka y Gorella) que en otros cultivares más firmes (Selva, Camarosa, Holiday y Elsanta) (Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que las expansinas contribuyen a la maduración de la fruta y pueden ser responsables del grado de reblandecimiento en los distintos cultivares de fresa (Dotto *et al.*, 2006).

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

derivados pectínicos oligogalacturónidos (OGA) envueltos en procesos de defensa. De hecho, los frutos transgénicos de fresa obtenidos fueron más resistentes a *Botrytis cinerea* que los frutos control procedentes de *F. vesca* (Osorio *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2011).

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

El proceso de maduración de la fresa va acompañado de un aumento del contenido hídrico del fruto. Cambios en la expresión de genes que codifican para acuaporinas durante los procesos de crecimiento y maduración del fruto han sido asociados con un incremento del reblandecimiento del fruto. El reblandecimiento es consecuencia de una reducción en el turgor celular (Thomas *et al.*, 2006; Saladiè *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2008, 2009). La disminución de turgor puede ser atribuida a la pérdida de agua que sigue a la acumulación de solutos en el apoplasto durante la maduración (Wada *et al.*, 2008). En el fruto de fresa, la expresión génica de *FaPIP1* y *FaPIP2* fue mayor en frutos de un cultivar más firme (Camarossa) en comparación con la que se encuentra en un cultivar más blando (Toyonaka). Además, la co-expresión de los genes *FaPIP1;1* y *FaPIP2;1* resultó en un aumento de la permeabilidad al agua en los frutos (Alleva *et al.*, 2010; Yaneff *et al.*, 2014). Estos datos parecen indicar que ambos genes podrían ser responsables del control de la homeostasis del agua celular y de su acumulación, que puede estar relacionada con el mantenimiento de la turgencia de los frutos (Mut *et al.*, 2008; Alleva *et al.*, 2010). Recientemente se ha aislado y caracterizado el gen *FaNIP1;1*, que codifica para una acuaporina de tipo *nodulin 26-like* y que se expresa a lo largo del proceso de maduración. Sobreexpresando la proteína en levaduras como sistema heterólogo, se ha demostrado un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando la capacidad de esta proteína de transportar agua, además de solutos como glicerol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y boro. También se demostró un incremento de la expresión del gen en condiciones de estrés hídrico en frutos, tanto realizados *in planta* como en frutos cortados; además también se indujo la expresión del gen *FaNIP1;1* en cultivos celulares de fresa, sometidos a presión osmótica con una solución de manitol (que provoca una condición de estrés hídrico en la célula). Usando una proteína de



fusión a GFP se demostró que FaNIP1;1 se localiza en la membrana plasmática. Todo ello parece demostrar que FaNIP1;1 juega un papel importante en el incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática, que permite la acumulación de agua en el receptáculo del fruto de fresa a lo largo del proceso de maduración (Molina-Hidalgo *et al.*, 2015).

El fruto de fresa es rico en ácido *L*-ascórbico. La ruta que usa el *D*-galacturonato como sustrato inicial es funcional en el fruto maduro, pero la contribución de otras rutas a la biosíntesis de ácido *L*-ascórbico no ha sido estudiada. La transcripción de genes que codifican enzimas biosintéticas como la *D*-galacturonato reductasa (*FaGalUR*), la *myo*-inositol oxygenasa (*FaMIOX*), y la monodehidroascorbato reductasa (*FaMDHAR*) se correlacionan positivamente con un incremento de *L*-ascórbico durante la maduración del fruto (Cruz-Rus *et al.*, 2011). Por otra parte, existen evidencias de que la biosíntesis del ácido *L*-ascórbico en fresa podría realizarse a partir de ácido *D*-galacturónico, principal componente de las pectinas de la pared celular, y estaría catalizada, al menos parcialmente, por una *D*-galacturonato reductasa dependiente de NADPH (*GalUR*) (Agius *et al.*, 2003). Así, el máximo nivel de expresión del gen *FaGalUR* en el estadio rojo de maduración coincide con el aumento de solubilidad de las pectinas, debido a la acción de las pectato liasas, y con el máximo contenido de ácido ascórbico que se observa en el fruto maduro, lo que apoya la ruta propuesta por Agius *et al.* (2003) para la biosíntesis del ácido *L*-ascórbico en el fruto de fresa. Recientemente, se ha llevado a cabo la sobreexpresión del gen de fresa *FaGalUR* en tomate (Amaya *et al.*, 2015). En general, la sobreexpresión de *FaGalUR* aumentó la capacidad antioxidante total en los tomates transgénicos y los resultados del análisis metabólico de dichos frutos sugieren un estricto control del contenido de ácido ascórbico, probablemente vinculado a una compleja regulación del estado redox celular y de ajustes metabólicos (Amaya *et al.*, 2015).

El proceso de maduración viene acompañado también de un aumento de las antocianinas presentes en el fruto. Esto supone un incremento de la expresión de genes involucrados en su síntesis como la PAL, CHS, F3H y DFR (Gong *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2001). Concretamente, y teniendo en cuenta que la síntesis de antocianinas se produce dentro de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, se ha detectado una inducción general de los genes envueltos en ella (Anterola *et al.*, 2002). Igualmente, la síntesis de antocianinas durante la maduración parece estar regulada por la síntesis *de novo* de la enzima PAL (Hirner *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001) que es inhibida por la aplicación de auxinas (Given *et al.*, 1988a). La actividad de esta enzima parece presentar dos picos de expresión durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto. Así, un primer pico aparece en el fruto verde cinco días después de la anthesis y cuando existe un nivel muy alto de fenoles solubles; y el segundo pico

aparece 27 días después de la antesis, cuando el fruto está maduro (Cheng y Breen, 1991). Por otro lado, se ha aislado y caracterizado el gen *FaDFR* que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) potencialmente involucrada en el último paso de la ruta común a la biosíntesis de antocianinas y taninos condensados (Moyano *et al.*, 1998). Este gen es específico de fruto de fresa y, aunque su máximo de expresión se observa en los estadios de maduración del fruto, su expresión también se detecta en frutos en desarrollo (verdes). Esto sugiere una posible implicación de este gen no sólo en la producción de color en el fruto, sino también en la síntesis de los taninos condensados que se producen en los estadios iniciales de desarrollo (Moyano *et al.*, 1998). Recientemente, se ha demostrado que existen dos variantes del gen DFR y que su ratio de expresión condiciona la acumulación de pelagornidina en el fruto, sugiriendo diferente especificidad de sustrato (Mioisic *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha propuesto que los genes *FaMYB1*, *FaMYB10*, *FaMADS9*, *FaSHP* y *FaGAMYB*, que codifican factores de transcripción de tipo MYB y MADS-box, podrían desempeñar funciones reguladoras de la síntesis de antocianinas y flavonoles durante la maduración del fruto de fresa (Aharoni *et al.*, 2001b; Lin-Wang *et al.*, 2010; Salvatierra *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2011; Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Vallarino *et al.*, 2015) (*Introducción general, apartado 4.2.2*).

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

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

reveló la importancia de FaPOD27 para la formación de lignina durante el proceso de maduración y la firmeza en los frutos de fresa, así como un componente del mecanismo de defensa del fruto frente a ataques bacterianos (Yeh *et al.*, 2014).

Paralelamente, un nuevo gen de tipo *GAST*, *FaGAST2* (Moyano-Cañete *et al.*, 2013) ha sido identificado. Su expresión mostró un incremento a lo largo del desarrollo y la maduración del fruto de fresa, coincidiendo con las etapas de reducción de expansión de la fruta (V3-B y R-SM). *FaGAST2* comparte con *FaGAST1* (de la Fuente *et al.*, 2006) homología de secuencia a nivel aminoacídico y nucleotídico del 31 % y 15 % respectivamente, pero ambos genes contienen un péptido señal y un dominio altamente conservado de tipo GASA en el extremo carboxilo terminal. La expresión de *FaGAST2* está confinada principalmente al receptáculo del fruto de fresa y no está regulada por auxinas, GA<sub>3</sub> ni ABA, pero sí por etefón, un generador intracelular de etileno. Además, la expresión de *FaGAST2* incrementa en condiciones de estrés oxidativo provocadas por agua oxigenada y/o infección por *C. acutatum*, sugiriendo un papel directo de *FaGAST2* en la eliminación de especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento y maduración del fruto y la infección fúngica (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Por otro lado, la sobre-expresión de *FaGAST2* en diferentes líneas de plantas de fresa transgénicas analizadas provocó el retraso en el crecimiento de las mismas y una reducción del tamaño de los frutos transgénicos. Análisis histológicos llevados a cabo en dichos frutos confirmaron que las células del parénquima de dichos frutos eran de menor tamaño, corroborando la idea de la existencia de una relación entre la expresión de *FaGAST2*, la elongación de las células del fruto de fresa y el tamaño del fruto (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Sin embargo, el silenciamiento transitorio de *FaGAST2* mediante ARN interferente provocó un aumento en la expresión de *FaGAST1* sin observar cambios en el tamaño de las células del fruto. Estos resultados apoyan la hipótesis de que ambos genes pueden actuar de manera sinérgica para determinar el tamaño celular del fruto durante el desarrollo y la maduración del mismo (Moyano-Cañete *et al.*, 2013).

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

## 8. Genes implicados en la mejora de fresa

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

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

#### 8.1.1. Resistencia a agentes abióticos

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

Se sabe que las plantas anuales y perennes de invierno que crecen a bajas temperaturas desarrollan tolerancia frente a la congelación. Así, mediante la utilización de una genoteca de ADNc de plantas de fresa aclimatadas al frío (*Fragaria cold-regulated*, *Fcor*) se consiguieron identificar varios genes (*Fcor1*, 2 y 3) que presentaban expresión diferencial a bajas temperaturas (NDong *et al.*, 1997). Mientras que *Fcor1* y *Fcor2* se expresaron en todos los tejidos analizados, la expresión de *Fcor3* fue específica de hojas. También, se ha aislado una proteína quinasa calcio-dependiente (CDPK) que parece estar involucrada en la tolerancia al frío en fresa (Llop-Tous *et al.*, 2002). *FaCDPK1* se expresa en raíces, estolones, meristemos, flores, hojas y en frutos a partir del estadio blanco. Además, también se ha observado un incremento significativo de los niveles de transcrito del gen *FaCDPK1* después de 10 h de tratamiento en frío (4 °C), lo que sugiere para esta proteína un papel tanto a nivel de desarrollo de la fruta como en respuesta a bajas temperaturas. Por otra parte, también ha sido clonado en fresa el factor de

transcripción CBF1 que participa en la aclimatación de *Arabidopsis thaliana* a bajas temperaturas (Owens *et al.*, 2002). No obstante, el análisis de los frutos obtenidos a partir de dos líneas transgénicas de fresa sobre-expresando el gen *FaCBF1*, no mostró cambios significativos en su tolerancia a la congelación (Owens *et al.*, 2002).

Para conferir resistencia al frío en plantas de fresa, también se han utilizado genes foráneos. Así, el gen de trigo *Wcor410a dehidrina ácida*, cuyo nivel de expresión se correlaciona con el grado de tolerancia a la congelación de diferentes genotipos de trigo (Houde *et al.*, 2004), se empleó para obtener líneas transgénicas de fresa con altos niveles de expresión de este gen. Las plantas transgénicas obtenidas presentaron un mayor grado de aclimatación al frío y de tolerancia a la congelación. La sobre-expresión con el promotor *rd29A*, inducible por estrés (deshidratación, estrés salino, bajas temperaturas) unido al gen de arroz *RdreB1B1*, codificante de un factor de transcripción de unión tipo DRE (elementos de respuesta a la deshidratación) también mostró una mejora significativa en la tolerancia al frío (Gu *et al.*, 2013). Análisis transcriptómicos de estas plantas transgénicas sometidas a estrés de baja temperatura permitieron la identificación de un gran número de factores de transcripción y genes implicados en la biosíntesis de antocianinas regulados diferencialmente (Gu *et al.*, 2015). Otro sistema empleado para incrementar la resistencia de las plantas de fresa a las heladas es la transferencia de la proteína AFP codificada por genes anticongelantes de peces antárticos (AFP). De esta manera, se han obtenido plantas transgénicas de fresa aunque no hay información concluyente sobre su tolerancia al frío (Khammuang *et al.*, 2005). No obstante, a partir de fresa y otros cultivos, se han aislado e identificado un gran número de genes que son inducidos por el frío, aunque aún se conoce poco sobre su función en la resistencia al frío.

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

La osmotina es una proteína relacionada con la patogénesis que inicialmente fue identificada en cultivos celulares de tabaco en condiciones de estrés salino. Muchos estudios han demostrado

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

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

Otro péptido importante en la protección de las células frente al daño oxidativo causado por el estrés salino y por la infección de patógenos es la metionina sulfóxido reductasa (PMSR). Recientemente, se ha aislado el gen *Fapmsr* a partir de frutos de fresa y se ha comprobado que su expresión es específica de receptáculo de frutos rojos maduros (López *et al.*, 2006). La proteína recombinante FaPMSR expresada en *E. coli* redujo el sulfóxido de metionina libre a metionina, protegiendo así a su hospedador frente al daño producido por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por consiguiente, los resultados obtenidos coinciden con la hipótesis de que el programa de transcripción durante la maduración de la fresa induce estrés oxidativo (Aharoni *et al.*, 2002b).

Recientemente, ha sido identificada y caracterizada una putativa peroxidasa en fresa (FaPRX27) (Ring *et al.*, 2013). Las peroxidasas catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al tomar electrones de varias moléculas donadoras. La clase III de las peroxidasas de plantas oxidan moléculas donadoras de

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

### 8.1.2. Resistencia a agentes bióticos

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

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

El loci monogénico dominante *Rfp1*, vinculado a marcadores SCAR (desarrollado a partir de los RAPD), está asociado a la resistencia a *Phytophthora fragariae* (Haymes *et al.*, 1997). Además, se ha analizado un amplio rango de genotipos de *F.* × *ananassa* con otro loci dominante *Rfp*.

Paralelamente y, mediante el estudio genético de poblaciones segregantes, también se ha estudiado la variación genética asociada a la resistencia a *Phytophthora cactorum* (Shaw *et al.*, 2008). Para ello, ha sido de gran ayuda la caracterización molecular y bioquímica del péptido fitotóxico extracelular PcF producido por *Phytophthora cactorum*. Esto ha ayudado a conocer las características del proceso de patogenicidad y está permitiendo asentar las bases para realizar bioensayos e identificar genotipos resistentes de fresa (Orsomando *et al.*, 2001).

Otro patógeno que infecta a la fresa es *Verticillium dahliae*. Este organismo es transmitido desde el suelo a la planta y ataca a los tejidos vasculares causando graves pérdidas. Estudios de la resistencia frente a este patógeno en diferentes variedades de fresa indican que ésta se basa en factores poligénicos con efecto aditivo, aunque no se ha descartado la herencia mendeliana (Zebrowska *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios similares realizados en varias variedades de fresa y sus correspondientes poblaciones F1, indicaron que tanto factores monogénicos como poligénicos están involucrados en la resistencia a la marchitez causada por *Fusarium* (Mori *et al.*, 2005). En cualquier caso, hasta ahora no se han desarrollado marcadores moleculares asociados a locus específicos implicados en la resistencia de la planta a estos hongos patógenos. Actualmente, se están desarrollando tecnologías cada vez más efectivas de secuenciación de ADN que nos permitirán el análisis de los genomas de plantas y microorganismos, facilitando el desarrollo de nuevos marcadores que permitirán el descubrimiento y mapeo fino de nuevos genes y compuestos vinculados al fenómeno de la resistencia. En este sentido, los análisis de secuenciación de genomas, tanto del género *Fragaria* como de otras especies de la familia Rosaceae, y su comparación, ha permitido identificar genes *RGA* (*Resistance Gene Analogs*) y microsatélites polimórficos relacionados con el fenómeno de la resistencia (Cipriani y Testolin, 2004; Folta *et al.*, 2005; Lewers *et al.*, 2005; Gil-Ariza *et al.*, 2006; Keniry *et al.*, 2006; Monfort *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Además, mediante el empleo de cebadores degenerados, se han amplificado y caracterizado varios tipos de genes *RGA* en tres especies diferentes de *Fragaria* (Martínez-Zamora *et al.*, 2004).

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



estos resultados está limitada por la falta de una normativa que regule el uso de cultivos transgénicos en Europa.

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

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

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

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

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

Mientras que la ruta de inhibición de la floración ha sido ampliamente estudiada en *F. vesca*, los factores implicados en su promoción permanecen inciertos. Por el momento, en *F. ananassa* se

ha identificado FaFT3 (FLOWERING LOCUS T) como un putativo promotor floral, cuya inducción bajo día corto o bajas temperaturas se considera un paso clave en la inducción floral (Nakano *et al.*, 2015).

La modificación de la época de floración y fructificación de un cultivo puede mejorar su producción de manera cuantitativa y cualitativa. Debido a ello, actualmente se está estudiando el efecto que tiene sobre el desarrollo de las plantas y su fructificación la modificación de su regulación hormonal para conseguir una mejora del cultivo de la fresa, de su capacidad de adaptación y de su resistencia a las enfermedades. Estas modificaciones pueden lograrse fácilmente mediante la introducción de genes capaces de alterar la regulación endógena del crecimiento vegetal (PGRs). Por otro lado, las auxinas han sido descritas como la principal molécula señal que coordina el crecimiento y desarrollo de los frutos de fresa. Recientemente, ha sido demostrado que dos genes YUCCA están implicados en la floración y desarrollo de la fresa. Concretamente, la sobre-expresión de *FvYUC6* produjo fenotipos típicos de plantas con alto contenido en auxinas, retraso en la floración y esterilidad masculina completa en *F. vesca* (Liu *et al.*, 2014). Además, el silenciamiento de *FvYUC6* mediante ARN interferente inhibió significativamente el crecimiento vegetativo, el desarrollo floral y los frutos se vieron ampliamente afectados, así como fue detectada una clara correlación entre el silenciamiento de *FvYUC6* y la expresión de un grupo de genes de respuesta a auxinas y los niveles de ácido indol-3-acético libre en dichas plantas transgénicas (Liu *et al.*, 2014).

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

mayor nivel de expresión del gen *rol C* presentaron hojas de menor dimensión y una disminución del tamaño de la planta (Mezzetti *et al.*, 2004b). Por otra parte, los ensayos agronómicos mostraron que la sobrexpresión del gen *rol C* en fresa modificó características de interés económico como son la adaptabilidad de la planta, la productividad y la tolerancia al tipo de suelo, así como la calidad de la fruta (Landi y Mezzetti, 2006).

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

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

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

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

La maduración de muchos frutos va acompañada de un reblandecimiento del tejido que termina con el deterioro irreversible de éstos. Este deterioro se debe fundamentalmente a la despolimerización y solubilización de la pared celular por la acción de numerosas proteínas,

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

En tomate (*Solanum lycopersicum*), se ha observado la expresión de varias expansinas que se han relacionado con la hidrólisis de polímeros de la pared celular y, por lo tanto, con el reblandecimiento del fruto (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Civello *et al.*, 1999; Brummell and Harpster, 2001; Li *et al.*, 2003). Igualmente, y a pesar de ser un fruto no climatérico, en fresa se han identificado varias expansinas cuya expresión varía a lo largo de la maduración y, una de las cuales (*FaExp2*) tiene una elevada homología de secuencia con una expansina expresada en el desarrollo temprano del tomate (Civello *et al.*, 1999). Aunque generalmente los genes expresados durante la maduración en fresa son regulados negativamente por auxinas, la expresión del gen *FaExp2* es independiente de estas hormonas. En general, todos los resultados descritos anteriormente sugieren que las expansinas participan en el proceso de maduración de los frutos y que, en frutos no climatéricos como la fresa, existen otros factores distintos a las auxinas que puede coordinar el inicio del proceso de maduración (Civello *et al.*, 1999).

El reblandecimiento del fruto también se está estudiando mediante el silenciamiento de la expresión de genes involucrados en la degradación de la pared celular (Mathews *et al.*, 1995; Woolley *et al.*, 2001; Jimenez-Bermúdez *et al.*, 2002; Palomer *et al.*, 2006; Sesmero *et al.*, 2007; Posé *et al.*, 2013). De este modo, dos EGases, también llamadas celulasas, han sido aisladas y estudiadas en fresa (*Facell* y *Facel2*), estando implicados ambos genes en la maduración del fruto (Harpster *et al.*, 1997; Manning, 1998; Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001; Spolaore *et al.*, 2003; Palomer *et al.*, 2006). La expresión del

ARNm de *Facell* muestra un aumento gradual durante la maduración y un pico de expresión con la aparición del color rojo en los frutos maduros (Harpster *et al.*, 1997; Llop-Tous *et al.*, 1999). Por el contrario, la expresión de *Facel2* se ha observado en frutos verdes y en tejidos verdes vegetativos (Llop-Tous *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999), por lo que este gen podría estar implicado en las modificaciones iniciales de la pared celular para facilitar tanto el crecimiento celular como la expansión (Woolley *et al.*, 2001). Además, existen diferencias en las estructuras secundaria y terciaria de ambas proteínas EGAsas sugiriendo que podría haber una especificidad de sustrato diferente (Llop-Tous *et al.*, 1999). De hecho, un dominio celulosa dentro de la estructura de *Facel2* podría indicar que esta EGasa puede ser especialmente activa frente a los xiloglucanos que cubren las microfibrillas de celulosa presente en la pared celular (Trainotti *et al.*, 1999). Por lo tanto, se ha propuesto que *Facel2* podría hidrolizar la red de xiloglucanos de la pared celular haciéndola más susceptible a la actividad hidrolítica de la *Facell* (Trainotti *et al.*, 1999; Woolley *et al.*, 2001). Para determinar el verdadero papel de ambos genes en el reblandecimiento del fruto de fresa durante la maduración, se han realizado estudios con el antisentido del gen *Facell* (Woolley *et al.*, 2001) en combinación con *Facel2* (Palomer *et al.*, 2006). Los frutos transgénicos obtenidos mostraron una reducción parcial de la actividad EGasa y cambios en la firmeza de la fruta (Woolley *et al.*, 2001; Palomer *et al.*, 2006). Así, se observó como la regulación de *Facel2* podría compensar la baja expresión de *Facell*, sugiriendo además que ambos genes no son los únicos responsables de la despolimerización de los xiloglucanos durante la maduración de la fresa (Palomer *et al.*, 2006). No obstante, debido a la especificidad de expresión del gen *Facell* en fruto, su promotor es un buen candidato para ser utilizado como herramienta biotecnológica.

Por otra parte, también se han aislado y caracterizado en fresa varias poligalacturonasas (PG1, PG2 y PG3) (*Introducción general, apartado 7*) (Nogata *et al.*, 1993; Salentijn *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2009) y, mediante análisis transcriptómicos en varios cultivares de fresa con diferentes firmezas, se ha comprobado su importancia en el proceso de maduración (Salentijn *et al.*, 2003). Recientemente, para aclarar la función de los genes *PGs* en el proceso de reblandecimiento de la fresa, se han generado plantas transgénicas con la expresión del gen *PG1* silenciada (Quesada *et al.*, 2009; Posé *et al.*, 2013). La mitad de las líneas transgénicas obtenidas mostraron frutos significativamente más firmes y una disminución de su reblandecimiento durante la postcosecha frente a los frutos control (Quesada *et al.*, 2009). En este sentido, los análisis indicaron que el silenciamiento del gen *FaPG1* se tradujo en una reducción de la solubilidad y despolimerización de las pectinas de la pared celular que condujo a una mayor integridad del tejido y una mayor firmeza de la fruta (García-Gago *et al.*, 2009). Más recientemente, en líneas con una reducción de los niveles de expresión del gen *FaPG1* superior al 90 %, se ha demostrado que este incremento de la firmeza es predominantemente

debido a una disminución de la solubilización y despolimerización de las pectinas, que se correlaciona más estrechamente con las uniones de las paredes celulares. Este limitado desensamblaje en las líneas transgénicas indica que estas fracciones de pectinas podrían desempeñar un papel clave en el mantenimiento de la integridad del tejido, lo que resulta en una fruta madura más firme (Posé *et al.*, 2013).

Paralelamente, también se han realizado en fresa estudios de expresión de varios genes que codifican pectato liasas (PL) (*Introducción general, apartado 7*), observándose un incremento de su expresión durante el proceso de maduración del fruto (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Benítez-Burraco *et al.*, 2002.). Este comportamiento junto con su localización, determinada mediante estudios de inmunolocalización, parece indicar que los genes PGs tendrían una función importante en el proceso de despolimerización de la pared celular (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Este dato fue confirmado mediante el análisis de los frutos transgénicos obtenidos a partir de 33 líneas transgénicas independientes con la expresión del gen *plC* silenciada. Así, los frutos transgénicos analizados mostraron un incremento significativo de su firmeza y una disminución de su reblandecimiento durante la postcosecha comparados con los frutos control sin mostrar diferencias en su color, tamaño, forma y peso (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002). Recientemente, se han analizado de forma independiente tres líneas transgénicas con una reducción superior al 90 % en el nivel de transcrito correspondiente a pectato liasas (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). El análisis de estos frutos transgénicos mostraron diferencias cuantitativas y cualitativas de los polímeros de pectina de la pared celular del fruto que se tradujo en un incremento de su grado de firmeza (Santiago-Doménech *et al.*, 2008). Estos resultados indican que los genes *pl* juegan un papel muy importante en la degradación de la pared primaria y lámina media durante la maduración del fruto de fresa lo que los hace muy atractivos como herramientas biotecnológicas para retrasar y/o regular el reblandecimiento del fruto durante y tras su cosecha.

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

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

### 8.3.2. Mejora del sabor

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

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

En los últimos años, el interés por mejorar el sabor de las variedades de fresa comercial ha ido incrementando. Muchos son los esfuerzos dirigidos a este objetivo a través del empleo de estrategias basadas en la genómica para la identificación de genes que controlan el sabor del fruto y posteriormente diseñar marcadores moleculares duraderos para seguir estos genes en las



poblaciones reproductoras. Uno de estos marcadores es la  $\gamma$ -decalactona, un compuesto volátil que confiere una nota de sabor de melocotón a las frutas. Asociado a la presencia de este compuesto volátil se ha identificado a una desaturasa de ácidos grasos omega-6, FaFAD1, ya conocida por participar en la producción de lactona en hongos. Este gen, que induce su expresión a lo largo de la maduración del fruto de fresa, fue detectado en ciertas cosechas y se correlacionó con la presencia de  $\gamma$ -decalactona. De hecho, el gen *FaFAD1* está presente en los genotipos donde se ha detectado  $\gamma$ -decalactona y está ausente invariablemente en los genotipos no productores de tal compuesto (Chambers *et al.*, 2014).

### 8.3.3. Mejora del color

La fresa es un fruto que presenta una biosíntesis de flavonoides de tipo bifásica. Mientras que, en el receptáculo inmaduro los niveles de proantocianidinas se acumulan, hecho que se asocia con la disuasión de herbívoros y la defensa del fruto frente a patógenos, en los receptáculos maduros las antocianinas que aportan el color rojo característico se producen, entre otras cosas, para atraer a los herbívoros y favorecer la dispersión de las semillas. Recientemente, se han llevado a cabo experimentos de down-regulación de una de las ramas de la ruta de biosíntesis de proantocianidinas (Fischer *et al.*, 2014). Como resultado, la proporción de unidades monoméricas de epicatequina contenidas en las cadenas de polímeros de proantocianidinas se redujo, pero este no fue el caso para las unidades iniciadoras de epicatequina. También se observó un acortamiento en la longitud de las cadenas de proantocianidinas. No obstante, en frutos inmaduros de las líneas silenciadas mediante ARNi, así como en los estigmas de las flores, otro tejido formador de epicatequina, se detectaron actividades enzimáticas dirigidas a la producción de color, por lo que el silenciamiento de la antocianidina reductasa (ANR) indujo una redirección de la vía de las proantocianidinas que conduce a la biosíntesis de antocianinas a través de glucosilaciones enzimáticas como ruta alternativa (Fischer *et al.*, 2014). Esta redirección también fue observada en la biosíntesis de flavonol, que es paralela a la mayor viabilidad del polen en las líneas silenciadas (Fischer *et al.*, 2014). De este modo, las líneas transgénicas con el gen ANR silenciado mediante ARNi proporcionan una herramienta versátil para el estudio de las funciones biológicas de las proantocianidinas.

## 9. Alérgenos de la fresa

Al igual que otras frutas, las fresas contienen proteínas que producen reacciones alérgicas. En fresa, la familia de proteínas Fra a 1 presenta homología con el alérgeno Bet v 1 de abedul, el cual incluye varios péptidos de unión a la IgE (Karlsson *et al.*, 2004; Musidłowska-Persson *et*

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

Otros alérgenos de fresa son las profilinas y las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), que se encuentran muy expresadas en el fruto y se acumulan, principalmente, en situaciones de estrés abiótico (Yubero-Serrano *et al.*, 2003). No obstante, la expresión en levaduras de LTPs y profilinas de fresa aisladas a partir de una genoteca de ADNc, mostró una menor alergenicidad de estas proteínas que sus homólogos de manzana y/o melocotón, por lo que podrían ser empleadas en tratamientos de inmunoterapia (Zuidmeer *et al.*, 2006).

## **10. Importancia económica del fruto de fresa**

La variedad *Fragaria × ananassa* Duchesne ex Rozier notho subsp. *ananassa* forma parte regular de la dieta de millones de personas y se cultiva en diferentes regiones del mundo, desde el Ártico hasta los Trópicos. Más de 80 países en el mundo presentan una producción significativa de fresa alcanzando en los últimos 20 años hasta 4.6 millones de toneladas métricas (FAO, 2012). La mayor parte de la producción tiene lugar en el hemisferio norte (98 %), aunque no existen barreras genéticas ni climáticas que impidan la expansión hacia el sur. España representa el primer productor de fresa fresca de Europa y el segundo del mundo, tras Estados

Unidos (FAO, 2012). EE.UU es el país líder en producción de fresa, con aproximadamente un 25 % de la producción mundial, seguido por España, Turquía, Egipto, Rusia y Japón (Figura 10) (FAO, 2012). La producción ha crecido de forma constante durante las dos últimas décadas en EE.UU., España, Turquía, Méjico y República de Corea; mientras que se ha reducido en los últimos años en Francia, Rusia, Italia y Japón, después de un aumento espectacular en los años 1970 y 1980. Si bien no existen datos oficiales referentes a la producción china, las estimaciones del departamento estadounidense de agricultura cifraron la producción en 1.950.000 millones de toneladas en la temporada 2009/2010 (<http://www.usdachina.org>).

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

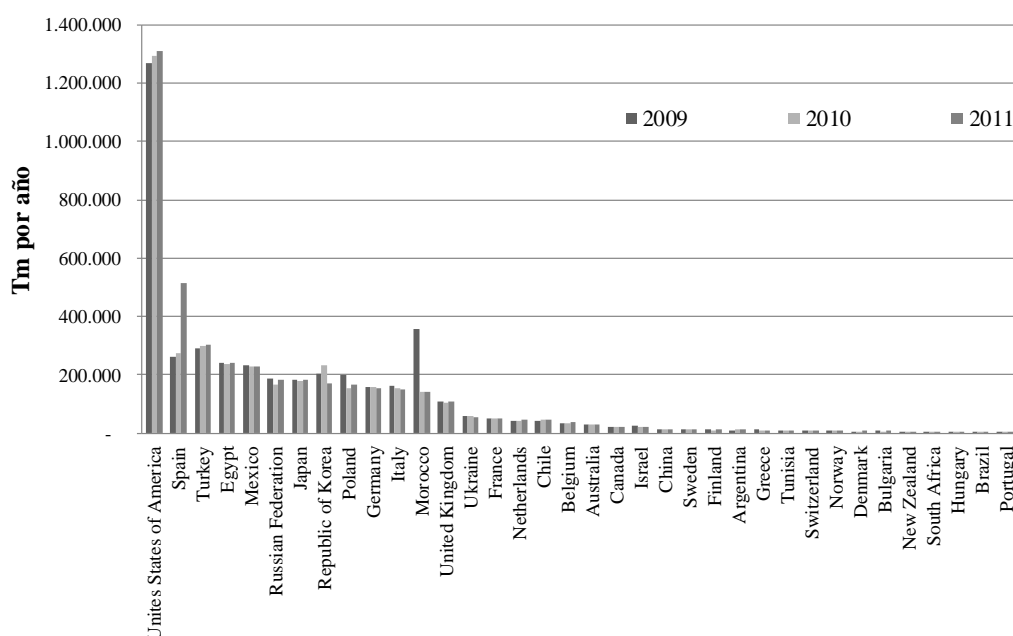


Figura 10: Principales países productores de fresa en el mundo (FAO, 2012)

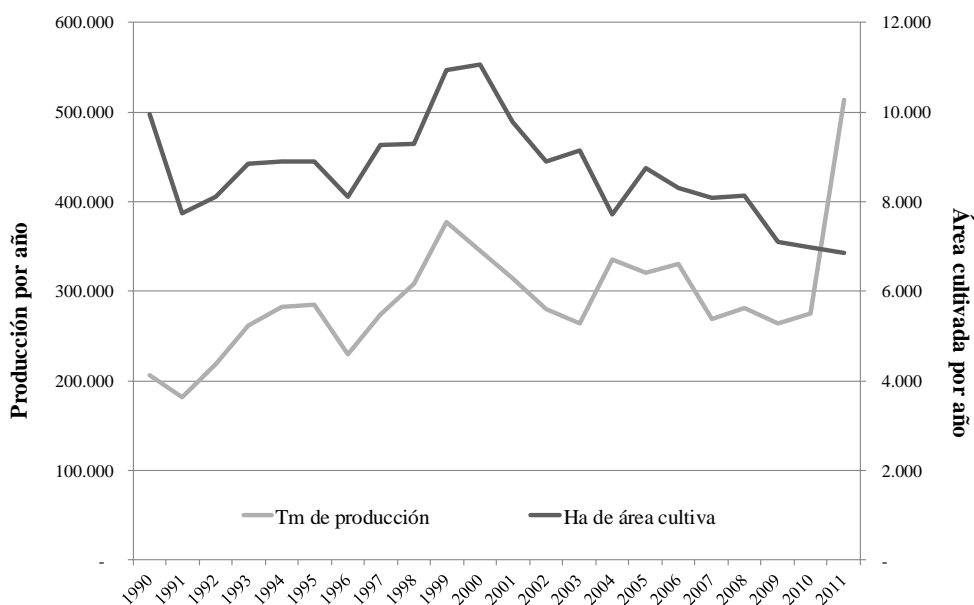


Figura 11: Producción de fresa en España y área cultivada

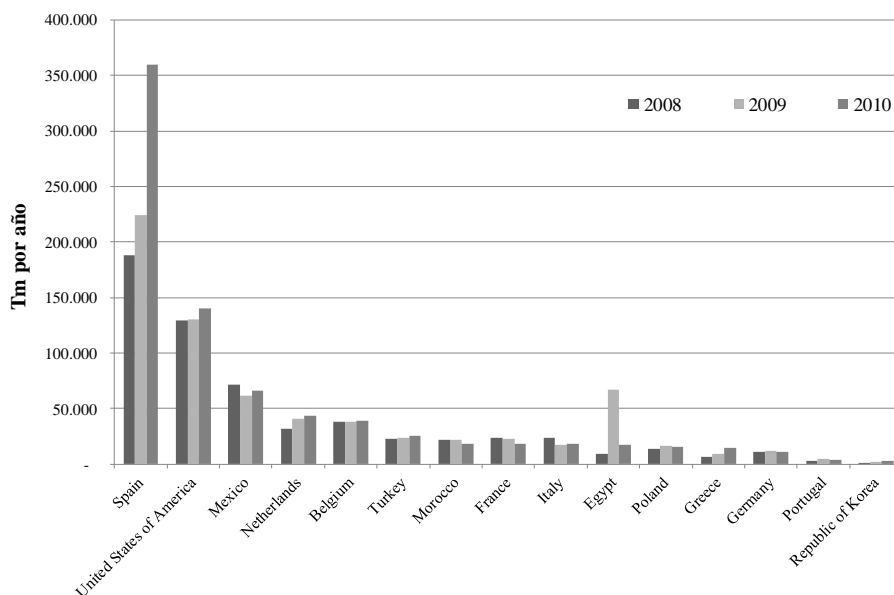


Figura 12: Exportaciones mundiales de fresa (FAO, 2012)

Debido al coste de la investigación, la aplicación rentable de la biotecnología al cultivo de muchas frutas, verduras, árboles frutales y frutos secos está limitada. Además, la experimentación con cultivos perennes como árboles frutales, bayas y frutos secos es

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

## **OBJECTIVES**

## OBJECTIVES

**OBJECTIVES**

The objectives of this thesis were the following:

- 1.- Identification and functional characterization of the key gene in the biosynthesis pathway of abscisic acid, *FaNCED1*.
- 2.- Identification and selection of genes with specific expression of strawberry fruit receptacle, inducible during its ripening, positively regulated by abscisic acid and negatively regulated by auxins during development using a custom-made oligo-based microarray platform.
- 3.- Functional characterization of strawberry *FaEOBII* gene by the analysis of its expression in fruit receptacles, achenes, vegetative plant tissues, flowers and petals and under different experimental conditions to determine the behavior of its expression and hormonal regulation.
- 4.- Determination *in vitro* of the binding affinity to *cis*-regulatory elements using a binding-protein microarray and *in vivo* the capacity of *trans*-activation of target promoters conducted by the R2R3 MYB transcription factor FaEOBII using a heterologous system.
- 5.- Evaluation of transitory silencing of *FaEOBII* to determine the regulatory role played as a transcription factor in the biosynthetic pathway of phenylpropanoid volatiles.
- 6.- Determination of *FaPRE1* gene expression along ripening process of strawberry fruit receptacles, achenes and vegetative tissues and evaluation of the role that auxins, ABA and gibberellins play in the regulation of *FaPRE1* gene expression.
- 7.- Generation of stably transformed plants overexpressing *FaPRE1* and transgenic fruit receptacles with the *FaPRE1* expression transiently silenced to determine the function of this helix-loop-helix transcription regulator.





# **SUMMARY GENERAL METHODS**



## SUMMARY GENERAL METHODS

### Plant material

Strawberry plants (*F. × ananassa* Duch. “Camarosa”, an octoploid cultivar; *F. vesca*, diploid wild strawberry; *F. virginiana* and *F. chiloensis*, two octoploid species and parentals of *F. × ananassa*) were grown under field conditions in Huelva (S.W. Spain). *F. × ananassa* fruits were harvested at different developmental stages: small-sized green fruits (G1, 2-3 g), full-sized green fruits (G3, 4-7 g), white fruits (W, 5-8 g), full-ripe red fruits (R, 6-10 g), overripe fruits (OR, 6-10 g) and senescent fruits (SN, 6-10 g). Selected overripe (OR) fruits were harder and dark redder than red (R) ones, while senescent (SN) fruits were softer. Other tissues were harvested as well, such as stolons, roots, crowns, flowers, petals and expanding leaves. *Nicotiana benthamiana* and strawberry plants (*F. × ananassa* Duch. “Elsanta”) used for agroinfiltration were grown in plant chambers at 25 °C, 10.000 lux and 80 % humidity and were afterwards held in a greenhouse. Strawberry *in vitro* plants of *F. × ananassa* Duch. “Chandler” were used for treatments with gibberellic acid and paclobutrazol and stable transformation. All tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

### Auxin treatment

Achenes of two sets of 50 full-sized green fruits (G3) each were carefully removed from their receptacles. One set of de-achened G3 fruits 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 of G3 de-achened fruits (control group) was treated with the same paste, but without IAA. The G3 de-achened fruits were covered with lanoline paste in order to avoid water stress. Auxin treatments, sample collection and analysis were performed according to Medina-Puche *et al.* (2014).

### Water stress treatment

Fruits at the G-W stages from *Fragaria × ananassa* “Elsanta” were used in this experiment. For water stress treatments, fruit pedicels were kept outdoors, whereas those of control fruits were immersed in a MS medium with sucrose (renewed every two days) in control fruits. The stress treatment condition and sample analysis was performed following the instructions by Medina-Puche *et al.* (2014).

### **Nordihydroguaiaretic acid treatment**

Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) is an ideal inhibitor of the NCED enzyme and was used to block ABA biosynthesis (Creelman *et al.*, 1992). Strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* “Elsanta”) at mature G3 stages were used in this study. The treatment was performed in accordance with Medina-Puche *et al.* (2014). These samples were used for ABA content measurement and relative expression of gene.

### **Gibberellic acid and paclobutrazol treatment**

Strawberry fruits were injected at G2 stage with paclobutrazol (PAC) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). PAC is a triazole that slows plant growth blocking the synthesis of gibberellins. The selected strawberry fruits for the experiments were injected with 1-2 ml of PAC 100 uM, 100 μM GA<sub>3</sub> and water in the case of control fruits. For each treatment, three replicates were performed. Treated fruits were harvested after 24 hours of experimentation, immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 ° C until use.

For plant experiments, *in vitro* strawberry plants, micropropagated in a N30K medium supplemented with 2.2 mM kinetin according to Barceló *et al.* (1998), were treated with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (100 μM) and paclobutrazol (PAC) (100 μM) and kept in growth chamber during 11 days prior harvest. Three sets of two plants each were treated, harvested and compared with control plants untreated.

### **Preparation of deuterated abscisic acid and ABA extraction procedure**

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).

### **HPLC-MS conditions**

In order to determine the ABA amount in strawberry fruits, we used an HPLC-MS system (VARIAN 1200L Triple Quadrupole) with a column (150 x 2.1 mm i.d. Phenomenex 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).

### Solid-phase micro extraction of eugenol

Eugenol was analysed in *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” fruits infiltrated with *A. tumefaciens* carrying pFRN or pFRN-*FaEOBII*, pK7WG2.0 or pK7WG2-*FaEOBII* and *Fragaria* × *ananassa* “Camarosa” and *Fragaria vesca* fruits at different developmental stages. Ten strawberry fruits were harvested per sample and three samples were measured on each occasion. Fruits were ground to a fine powder under liquid nitrogen. 300 µl of saturated NaCl was added to 1 gram, 200 mg or 10 mg of powdered *F. × ananassa*, *F. vesca* white or red fruits, respectively. 3 ng of β-caryophyllene was added as an internal standard. Solid-phase micro extraction was performed on a 7890A GC- system (Agilent, <http://www.home.agilent.com/>) coupled to a 7200A QTOF-MS (Agilent). Samples were incubated for 10 minutes at 50 °C, after which volatiles were extracted on a 100 µm PDMS fibre (Supelco, [www.sigmaaldrich.com/Supelco](http://www.sigmaaldrich.com/Supelco)) for 30 min at 50 °C. Extracted compounds were desorbed for 1 min at 250 °C in the injector port in splitless injection mode. Volatiles were separated on a HP5MS column (5 % phenyl methyl silox, 30 m x 250 µm x 0.25 µm), with a constant helium flow of 1.2 mL/min. Oven temperature was set to 40 °C for 3 min, ramped with 5 °C/min until 250 °C, and held at 250 °C for 5 min. Twenty mass spectra were recorded every second (m/z 30-500) at an ionization energy of 70 eV. Eugenol was measured in commercial strawberry and no eugenol was detected above the detection limits of the system. Therefore, a calibration curve of eugenol (Acros organics) carried out in extracts of these strawberries lacking eugenol was used to identify and quantify it. Statistical significance was tested with one-way ANOVA and a LSD post-hoc test or with a student’s t-test using SPSS software.

### Chlorophyll and anthocyanidin extraction and quantification procedure

Chlorophylls in 100 mg of the frozen tissues (fresh weight) were extracted with 1,7mL of 80 % acetone in darkness during 30 min. Samples were centrifugated at 3000 rpm for 15 min at 4 °C. Supernatants were kept on ice and darkness. Extraction procedure was repeated for 2 times more and supernatants were mixed. Chlorophylls contents of the samples were calculated from the absorbance at 645 nm and 663 nm of the extract solution. Chlorophyll A (mg/g) =  $[12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}] \times V/1000 \times W$ . Chlorophyll B (mg/g) =  $[22,9 \times A_{645} - 4,86 \times A_{663}] \times V/1000 \times W$ . V = volume of extract solution. W = fresh weight of tissues.

The anthocyanidin extraction was performed following the instructions by Medina-Puche *et al.* (2014). The anthocyanidin presence was measured at 515 nm. The amount

of anthocyanins was calculated by using  $E_{\text{molar}} = 36,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Woodward, 1972; Bustamante *et al.*, 2009). Three replicates were performed per each analysed treatment.

### **RNA isolation**

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

### **Microarray probe preparation, hybridization and statistical analysis**

For transcriptomic studies we have used a custom made oligo based (60-mer) Agilent platform containing all the singletons corresponding to those sequences published in the strawberry genome project (<http://www.strawberry.org>). It has been demonstrated that the sequences of ESTs from *Fragaria × ananassa* and *Fragaria vesca* presented a percentage of identity of 98.6 % (Bombarely *et al.*, 2010; Medina-Puche *et al.*, 2014).

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

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

For microarray hybridization, 200 ng of total RNA of each samples was labelled using Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. Six hundred ng of Cy3-labeled aRNA was hybridized on an 8x60K Sure Print G3 custom microarray (Agilent Technologies). The array was designed using eArray platform using the *Fragaria vesca* genome as a reference. After hybridization, arrays were washed according to the manufacturer's protocol. Arrays were scanned with an Agilent Microarray Scanner. Images and intensity data were obtained using Agilent Feature Extraction v.10.7 software. After hybridization and array scanning, images of the physical hybridization were visually inspected for artefacts such as scratches, bubbles, and high regional or overall background. Thus, the non-uniformities in a scanned image were determined as outliers and thus excluded from downstream analyses.

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

### **Annotation of sequences from the EST library**

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

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

Expression analyses of *FaEOBII* (KM099230), *FaPRE1* (KM655802) and genes herein analysed and studied in all physiological conditions were performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using a iCycler system (BioRad), as previously described (Benítez-Burraco *et al.*, 2003). First-strand cDNA was obtained from 2 µg total RNA using iScript kit (BioRad), following manufacturer instructions. Table 4 [see *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*] 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 (Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Raab *et al.*, 2006; Encinas-Villarejo *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010, 2011; Cruz-Rus *et al.*, 2011; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). All these values were then used to determine the relative increase or decrease of gene expression in the samples as compared against those in control, in accordance with Pedersen (2001).

Interspacer 26S–18S gene (primers 5'- ACC GTT GAT TCG CAC AAT TGG TCA TCG -3' and 5'- TAC TGC GGG TCG GCA ATC GGA CG -3') was selected as control gene owing to its constitutive expression throughout all of the different tested experimental conditions (*Additional files; Additional table 1*). The efficiency of each particular qRT-PCR and the melting curves of the products were also analysed to ensure existence of a single amplification peak corresponding to a unique molecular species (e.g.  $T_m$  of *FaEOBII* gene was 87 °C,  $T_m$  of *FaPREI* gene was 90 °C and the *interspacer 26S-18S* gene was 91.5 °C).

### **Cloning full-length cDNA of *FaEOBII* and sequence analysis**

We used the 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/>) for the *in silico* study of the *FaEOBII* gene sequence. To compare the nucleotide *FaEOBII* sequence against databases, we used the NCBI BlastN program as an alignment tool. Multiple sequence alignment and the phylogenetic tree construction were performed with the EBI ClustalW2 program or the MegAlign program (from the Lasergene suit) as well as the FigTree program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Prediction of domains and functional sites was performed with InterProScan database (version 4.8) ([www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)), and prediction of cellular location was performed with the WoLF PSORT program ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)). BlastN has also been used to determine gene location in *Fragaria vesca* genome in GDR databank (<http://www.rosaceae.org>).

### **Cloning and sequence analysis of full-length cDNA of *FaPREI* and *FaNCED1***

The full-length DNA of *FaPREI* and *FaNCED1* were isolated from total RNA of strawberry red fruit by rapid amplification of cDNA ends (RACE) using a Marathon cDNA amplification kit (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)). The

primers FaPRE1-forward, FaPRE1-reverse, FaNCED1-up y FaNCED1-low (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*) were used for 3' and 5' RACE amplifications, respectively. All PCR fragments obtained were separated by gel electrophoresis, purified using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) for sequencing. The full-length cDNA fragments were amplified by using primers specially designed to match the initial and final transcription zones of the gene (FaPRE1-FL-forward and FaPRE1-FL-reverse; FLNCED1-up and FLNCED1-low; Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*) and then sequenced.

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 the *in silico* study of both gene sequences. To compare nucleotide sequences against databases, we used the NCBI BlastN program as an alignment tool. 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 FigTree program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Prediction of domains and functional sites were performed with InterProScan database (version 4.8) ([www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)) and prediction of protein localization sites in cells was performed with Plant-mPLOC computer program (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLOC.cgi>). BlastN has also been used to localize the position of gene in *Fragaria vesca* genome in GDR databank (<http://www.rosaceae.org>).

### **Generation of RNAi and OE-*FaEOBII* constructs and transfection of strawberry fruit by agroinfiltration**

The genes *FaNCED1*, *FaEOBII* and *FaPRE1* were cloned into pFRN binary vector (Figure 8; *Materiales y Métodos; I.2.6. Vectores binarios*) using the Gateway technology (Invitrogen™, Darmstadt, Germany). A conserved region of cDNA from each gene was PCR-amplified and used in the silencing construct, using forward and reverse primers designed for this purpose (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*). The resulting fragments were cloned into pCR8/GW/TOPO (Invitrogen™) and subsequently transferred to the Gateway pFRN vector using LR clonase (Invitrogen™). The RNAi constructs generated (pFRN-*FaNCED1*, pFRN-*FaEOBII* and pFRN-*FaPRE1*) were tested by sequencing prior to strawberry plant transformation.

The 624-bp CDS of the strawberry *FaEOBII* was amplified from *Fragaria × ananassa* cDNA using the oligonucleotides attB1-EOBII-fw and attB2-EOBII-rv (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*) and cloned into the pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen<sup>TM</sup>) plasmid by the BP Gateway reaction (Invitrogen<sup>TM</sup>) and subsequently transferred to the Gateway pK7WG2.0 vector using LR clonase (Invitrogen<sup>TM</sup>). The overexpression construct generated (OE-*FaEOBII*) was tested by sequencing prior to strawberry plant transformation.

The *A. tumefaciens* strain AGL0 (Lazo *et al.*, 1991) containing the RNAi constructs (pFRN-*FaNCED1*, pFRN-*FaEOBII* and pFRN-*FaPRE1*) or empty pFRN vector and pK7WG2-*FaEOBII* or empty pK7WG2 vector was used to inject entire strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* “Elsanta”), according to Hoffmann *et al.* (2006). Overexpression of *FaEOBII* was carried out by the coinfiltration of *A. tumefaciens* harboring the silencing suppressor pTBSV-p19 (Voinnet *et al.*, 2003). A total of 15-25 strawberry plants and 30-40 agroinjected fruits were inoculated and analysed, respectively. The same protocol was followed to generate the *FaMYB10*-RNAi construct and silencing *FaMYB10* expression in strawberry fruits. Forward and reverse primers used for *FaMYB10* were 5'- AGA TGA CTA GAT GAT TGC TTG CCG - 3' and 5'- TGC CGG ACG ATT GCC AGG AAG -3' respectively (Medina-Puche *et al.*, 2014).

In all cases, the silencing or overexpression percentages were determined by comparing the amounts of *FaNCED1*, *FaEOBII*, *FaPRE1* or *FaMYB10* transcripts in RNAi- and OE-agroinjected fruits against those observed in empty pFRN or pK7WG2 vector agroinfiltrated fruits, respectively.

### **Generation of a *FaPRE1* overexpression construct and transformation of strawberry plants**

*FaPRE1* gene was cloned into pK7WG2.0 binary vector (Karimi *et al.*, 2002) using the Gateway technology (Invitrogen<sup>TM</sup>, Darmstadt, Germany). A 690-bp conserved region from the *FaPRE1* cDNA was PCR amplified for using it as a fragment in the overexpression construct. The following forward primer FaPRE1up-GW-over and reverse primer FaPRE1low-GW-over were used for that purpose (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*). The resulting fragment was cloned into pDONR<sup>TM</sup>221 vector (Invitrogen<sup>TM</sup>) using BP clonase (Invitrogen<sup>TM</sup>) and subsequently transferred to the Gateway pK7WG2.0 vector by specific recombination between both plasmids using LR clonase (Invitrogen<sup>TM</sup>). The overexpression construct generated (pK7WG2-*FaPRE1*) was tested by

sequencing and restriction analyses prior to transformation of strawberry plants. The binary vector construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pMP90) and then transformed into *Fragaria × ananassa* “Chandler” according to Barceló *et al.* (1998).

### Subcellular location analysis

The 624-bp CDS of the strawberry *FaEOBII* and the 282-bp CDS of the strawberry *FaPRE1* genes were amplified from *Fragaria × ananassa* cDNA using the oligonucleotides attB1-EOBII-fw, attB2-EOBII-rv, attB-PRE1-fw and attB-PRE1-rv (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*) and cloned into the pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen<sup>TM</sup>) plasmid by the BP Gateway reaction (Invitrogen<sup>TM</sup>). *FaEOBII* and *FaPRE1* were fused in frame with the green fluorescent protein (GFP) at N-terminal position by LR Gateway recombination (Invitrogen<sup>TM</sup>) in the destination vector pK7WGF2 (Karimi *et al.*, 2002), resulting in 35S::GFP::FaEOBII and 35S::GFP::FaPRE1 fusion constructs. The generated GFP constructs (pK7WGF2-*FaEOBII* and pK7WGF2-*FaPRE1*) were tested through sequencing prior to *Nicotiana* leaves transformation.

Agroinfiltration experiments were performed on *Nicotiana benthamiana* leaves. The *A. tumefaciens* strain GV3101 (Weigel *et al.*, 2006) containing either the pK7WGF2-*FaEOBII*, pK7WGF2-*FaPRE1* or the empty pK7WGF2 and the silencing suppressor pTBSV-p19 (Voinnet *et al.*, 2003), were grown at 28 °C in Luria Bertani (LB) medium with appropriate antibiotics. Cells were harvested and resuspended in an infiltration buffer (10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MES and 1 mM 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 cell carrying each construct and the empty pK7WGF2 vector were mixed with cell containing the p19 vector in pairwise, and left at room temperature for 2-4 h in darkness. Bacterial suspensions were syringe-infiltrated through the abaxial surface of the leaves, and material collected after four days. To locate nuclei precisely, *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.

### Expression of recombinant FaNCED1 protein in *Escherichia coli*

The vector pGEX-4T-1 (Amersham) was used for the expression of recombinant FaNCED1 protein in *E. coli* cells (BL21 Gold DE3 strain, Stratagene). The empty pGEX-4T-1 vector

served as control for the experiments. The FaNCED1 coding region was amplified using the primer NCED1-prot-fw and NCED1-prot-rv (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*). These oligonucleotides introduced an *EcoRI* and a *XhoI* restriction site at the 5' and 3' ends of the FaNCED1 PCR fragment, respectively, which were complementary to the restriction sites in the vector. The forward primer eliminated the native methionine ATG codon of FaNCED1 to obtain a frame fusion protein at the N-terminus. This peptide included an ATG translation initiation codon for glutathione S-transferase (GST). The expression construct (pGEX-4T-1-FaNCED1) was verified by restriction enzyme analysis and DNA sequencing before transformation into *E. coli* BL21 cells.

For recombinant FaNCED1 protein expression, 300 µl of an overnight liquid culture of transformed *E. coli* cells were grown in fresh Luria-Bertani medium (300 ml) supplied with ampicillin and chloramphenicol (100 µg/ml) 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 8 ml of 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 20000 g for 20–30 min. The soluble protein fraction (supernatant) was incubated with GST-sepharose (Novogen) for at least 30 min at 4 °C with continuous agitation and then centrifuged at 4 °C and 800 g for 3 min. The protein attached to the sepharose was washed three times with 8 ml of ice-cold wash buffer at 4 °C and 800 g for 5 min. Finally, the sepharose-bound protein was released by incubating for 5 min in 200 µl of elution buffer (50 mM TRIS-HCl, 1 mM glutathione, pH 8) at room temperature and centrifuged again at 800 g for 5 min. The eluate was quantified by Bradford's method (Bradford, 1976) and analysed by SDS-PAGE (12% Progel TRIS-Glycine, 1.0 mm, Anamed).

### ***In vitro* enzyme activity assay of protein FaNCED1**

After induction and purification process, the recombinant protein activity was assayed on substrates neoxanthin, 9-*cis*-zeaxanthin, 9-*cis*-violaxanthin and all-*trans*-neoxanthin at 0.1 mg / ml. 125 µl of each of the substrates with 62.5 µl of β-octyl glucoside (4 %, w/v) were mixed and allowed to dry under nitrogen stream. Then, 250 µl of protein were added, both in the form of crude extract and purified, and the solutions were mixed by vortexing vigorously. Subsequently, the assay was performed by incubating the reaction mixture for 12-16 hours at 30 °C under stirring and darkness.

Reactions incubated were extracted twice with equal volumes of ethyl acetate. The organic phase was dried under nitrogen stream and reconstituted in 100 % ethanol for later analyzed by thin layer chromatography (TLC) or 100 % methanol for HPLC-MS analysis.

### **Thin layer chromatography**

The products of the enzymatic reaction, previously reconstituted in ethanol, were visualized on a silica gel plate UV254. The plate was developed in a solvent mixture composed of n-hexane: isopropanol (90:10, v/v) in a closed gas chamber for 1-2 hours. The experiment was done in triplicate. After separation of the products, the TLC plates were allowed to dry. Subsequently, they were sprayed with spray with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-D) and dried in an oven at 60 °C for 5 minutes or until the appearance of colored dots for products. Finally, the gels were scanned for image acquisition thereof.

### **Extracting products from silica gel**

Purification and identification of products revealed in the silica gel, the color bands visualized on plates after silica thin layer chromatography were detached with a scalpel and collected in Eppendorf tubes. The products were extracted from the silica gel two times with 2 volumes of methanol by vigorous stirring at room temperature. The suspensions were centrifuged at maximum speed and the supernatant was collected in new tubes and centrifuged again to ensure complete removal of all particles of silica gel. The supernatants were collected in new tubes and the samples were concentrated under a nitrogen stream to an appropriate volume for subsequent HPLC-MS analysis.

### **Analysis of products by HPLC-MS**

Due to lack of commercial availability of the theoretical products C<sub>15</sub>-xanthosine and C<sub>25</sub>-epoxy-apocarotenal for use as internal standards, ABA was used as relative standard because of its similtud with C<sub>15</sub>-xanthosine.

The supernatants recovered after thin layer chromatography were processed for measurement by HPLC-MS (Agilent1100). The injection volume was 5 µl and Phenomenex C18 column was used, with an ID 150x2.0 mm and a particle size of 3 µm. The mobile phase used consisted of water/methanol (80:20, v/v) (0.1 % formic acid) at a flow of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. MS consisted of a

SMART-mode system and the flow of N<sub>2</sub> used was 10 L/min. The electrospray ionization voltage was set to -4000 V. The full scan mass spectra were measured in a scan range of m/z from 50 to 800, with a scan resolution of 13000 m/z/s until the objective of the ICC reached 20,000 ms or 200 ms, which was achieved first. Tandem mass spectrometry was carried out using helium as the collision gas (3.563×10<sup>-6</sup> mbar) with collision voltage fixed at 1 V. Spectra were acquired in positive and negative mode ionization. ABA and xanthosine were detected at a wavelength of 300 nm and the C<sub>25</sub>-epoxy-apocarotenal to 400 nm. To process the quantitative data obtained from the calibration standards and samples of plants DataAnalysis 5.1 (Bruker Daltonics) software was used.

### **Protein purification and determination of FaEOBII DNA-binding specificity**

Translational fusion of FaEOBII fused to MBP was obtained by cloning its corresponding cDNA into the pMAL-c2 vector (New England Biolabs) using Gateway technology. Donor template was obtained through PCR amplification of FaEOBII with specific oligonucleotides attB1-EOBII-fw (5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AAC AAT GGA TAA AAA ACC ATG CAA TTC ATC-3') and attB2-EOBII-rv (5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTC TCC ATT TAG TAA CTG CAT AGA CC-3') (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*). Recombinant insert was verified by sequencing and plasmid introduced into *E. coli* BL-21 strain. Expression and purification of recombinant protein was also described for the pMAL purification system (New England Biolabs). FaEOBII DNA-binding specificity was determined using protein binding microarrays (PBM11) using soluble protein extracts from an induced *E. coli* culture, as described by Godoy *et al.*, (2011).

### **Isolation and in silico analysis of CAD promoter**

The promoter region of *CAD* was identified from strawberry genome database (<http://www.strawberry.org>) (Shulaev *et al.*, 2011), and PLACE ([www.dna.affrc.go.jp](http://www.dna.affrc.go.jp)) was used to detect *cis*-acting regulatory DNA elements in *CAD* promoter (Higo *et al.*, 1999). For further analysis, a 2638 bp fragment of the promoter region, including the 5'-untranslated region (UTR) was isolated from genomic DNA using primers *pCAD*-up (5' - ACT CCG ACG TTT GTT GAG AGA - 3') and *pCAD*-low (5' - TCT CGA TCT GTG GCA GAT TCT T - 3') (Table 4; *Materiales y Métodos; II.3.5.2. Cebadores específicos empleados en la amplificación por PCR*) and following manufacturer instructions for Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific). PCR products were purified and cloned into the pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> entry vector

(Invitrogen™) by TOPO®TA-Cloning® (Invitrogen™). *pCAD1* was fused with  $\beta$ -glucuronidase (GUS) by LR Gateway recombination (Invitrogen™) in destination vector pKGWFS7 (Karimi *et al.*, 2002), resulting in pCAD1::GUS fusion. The generated GUS construct (pKGWFS7-*pCAD1*) was sequence-verified prior to *Nicotiana* leaves transformation.

### **Transient *trans*-activation assay in *N. benthamiana* leaves**

*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) cultures harbouring reporter or effector constructs were grown overnight and diluted in infiltration buffer [50 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 5.8, 0.5 % glucose, 2 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M acetosyringone] to an OD<sub>600</sub> of 0.3 prior to infiltration in *N. benthamiana* leaves. Combinations of reporter and effector constructs were co-infiltrated in leaves of glasshouse-grown *N. benthamiana* plants and incubated for 48 h. Infiltration regions were marked, and five leaf discs were pooled per sample. Six leaves on two plants were infiltrated for each effector/reporter combination (n = 6), and the experiment was repeated twice. To enable normalization, leaves were co-infiltrated with a CaMV 35S:LUC-harbouring *A. tumefaciens*.

Tissues were homogenized in liquid N<sub>2</sub>, and proteins were extracted from 50 mg of tissue in 150  $\mu$ l of cold luciferase cell culture lysis reagent (CCLR; 25 mM Tris-phosphate, pH 7.8; 2 mM DTT, 2 M 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (CDTA), 1 % Triton®-X-100, 10 % glycerol; Promega, <http://www.promega.com>), supplemented with a complete protease inhibitor (Roche, <http://www.roche.com>). Samples were vortexed for 30 sec and centrifuged at 4 °C for 30 min at 13 000 g. GUS activity of crude extracts was determined spectrophotometrically using 1 mM 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide in CCLR supplemented with 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol as substrate after a 30-min incubation period at 37 °C. Measurements were performed in a FluoroCount Microplate Fluorometer (Packard BioScience Company, <http://www.packardinstrument.com>) using a 360-nm excitation filter and a 460-nm emission filter. For LUC measurements, 20  $\mu$ l of extract was analysed in 80  $\mu$ l of luciferase assay buffer (20 mM Tricine, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33 mM DTT, 270  $\mu$ M co-enzyme A, 530  $\mu$ M ATP, 470  $\mu$ M D-Luciferin, pH 7.8; Leeuwen *et al.*, 2000), and measured in a FluoroCount Microplate Fluorometer (Packard BioScience Company) using a 560-nm emission filter (Van Moerkercke *et al.*, 2011).

For promoter analysis in *N. benthamiana* leaves and the *trans*-activation assays, the *pOD01*:GUS reporter construct was used as a control and *pCAD1*:GUS was used as a test. GUS and LUC activity were determined as described in Van Moerkercke *et al.* (2011). For the *trans*-activation assays, a 35S:*FaEOBII* was used as the effector construct. As a control, previously



described constructs 35S:*PhEOBII*, 35S:*AN2* and 35S:*LUC* (Verdonk *et al.*, 2005; Van Moerkercke *et al.*, 2011) were used.

## Anatomical sections of fruit parenchyma

### Light microscopy

Tissue sections were prepared as follows: small portions of strawberry receptacle tissue were fixed in Bouin's fixative (75 % (v/v) saturated picric acid, 25 % (v/v) formaldehyde and 0.05 % (v/v) glacial acetic acid), dehydrated through an ethanol–tertiary butanol series and embedded in “Paraplast Plus” (from Sherwood Medical Co.). Sections of about 8 µm were cut with a microtome, mounted on slides covered with gelatin, deparaffinized in xylene and rehydrated through an ethanol series. For structural and histochemical analysis, some sections were stained with Periodic acid and Schiff's reagent (PAS staining). Samples were covered with 0.5 % periodic acid for 2 min and, after washing in distilled water, were again covered with Schiff's reagent for 3 min. Then, samples were washed in distilled water, dehydrated and mounted in “Entellan New” (EMD Biosciences). In this staining, the periodic acid oxidizes carbohydrates creating aldehydes that react with the Schiff's reagent to give a purple-magenta colour.

### Yeast-two-hybrid screening and interaction study

For the yeast-two-hybrid studies, the ORF of the *FaPRE1* gene described was recombined into the pBDGAL4 bait vector (pDEST<sup>TM</sup>32; Invitrogen<sup>TM</sup>) and pADGAL4 prey vector (pDEST<sup>TM</sup>22; Invitrogen<sup>TM</sup>) by a Gateway<sup>TM</sup> LR reaction. For the yeast-two-hybrid screening, an expressed red strawberry fruit cDNA library was recombined into the pADGAL4 prey vector (courtesy of Dr. Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). The resulting bait and prey vectors were transformed into yeast strains PJ69-4a (MAT $\alpha$ ) and PJ69-4 $\alpha$  (MAT $\alpha$ ) (James *et al.*, 1996), respectively, and used in yeast-two-hybrid experiments as described by de Folter *et al.* (2005). ID for the genes identified are *gene04617* (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein 3), *gene11023* (ABC transporter I family member 10), *gene22974* (S-adenosylmethionine synthetase 2), *gene11411* (Graves disease carrier protein (GDC)), *gene09451* (DNA topoisomerase 2-beta), *gene00282* (ADP-ribosylation factor 2), *gene12417* (Stress response protein NST1), *gene12767* (Ubiquitin), *gene24981* (Branched-chain-amino-acid aminotransferase-like), *gene02728* (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1-alpha).

**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.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# MATERIALES Y MÉTODOS

## I. MATERIALES

### I.1. Material químico

#### I.1.1. Productos químicos

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

#### A

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

Acetato de litio ( $\text{LiCH}_3\text{COO}$ ) (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 (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 fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) (Merck)

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

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

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

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

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

Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Merck)

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

Ácido peryódico ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) (Panreac)

Ácido pícrico ( $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ ) (Merck)

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

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (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 (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>OH) (Sigma)  
 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>) (Sigma)  
 Ampicilina sal sódica (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S) (Sigma)  
 Ascorbato sódico (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>) (Sigma)  
 Adenosina 5'-trifosfato disódica (ATP) (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub>) (Sigma)  
 Azul de bromofenol (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) (Sigma)  
 Azul de Coomassie G250 (Amersham)  
 Azul de Toluidina (Sigma)

## B

Bacto-triptona (Difco)  
 Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)  
 6-bencil aminopurina (BA) (C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>) (Sigma)  
 Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma)  
 Bis-Tris (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>) (Sigma)  
 Bórax (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O) (Sigma)  
 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrClNO<sub>6</sub>) (Sigma)  
 Bromuro 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridio (Bromuro de etidio, BrEt) (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) (Sigma)  
 Butanol terciario (*tert*-Butanol) (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O) (Merck)

## C

Carbenicilina (C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>S) (Duchefa)  
 Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Sigma)  
 Citrato trisódico (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>×H<sub>2</sub>O) (Panreac)  
 Cloranfenicol (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Sigma)  
 Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) (Merck)  
 Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O) (Sigma)  
 Cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O) (Sigma)  
 Cloruro de litio (LiCl) (Merck)  
 Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) (USB)  
 Cloruro potásico (KCl) (Merck)  
 Cloruro sódico (NaCl) (Panreac)  
 Cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) (Panreac)

## D

Deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) (Pharmacia)  
 Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Pharmacia)  
 Deuteróxido de sodio (hidróxido de sodio deuterado) (NaOD) (Sigma)

4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) ( $C_{16}H_{15}N_5 \times 2HCl$ ) (Sigma)  
 Diclorometano (cloruro de metileno) ( $CH_2Cl_2$ ) (Merck)  
 Dietil pirocarbonato ( $C_6H_{10}O_5$ ) (DEPC) (Sigma)  
 N-N-dimetilformamida ( $C_3H_7NO$ ) (Merck)  
 Dimetil sulfóxido (DMSO) ( $C_2H_6SO$ ) (Sigma)  
 2,4-dinitrofenilhidrazina ( $C_6H_6N_4O_4$ ) (Sigma)  
 D-Luciferina ( $C_{11}H_8N_2O_3S_2$ ) (Sigma)  
 DNasa I RNasa free (Invitrogen<sup>TM</sup>)  
 Ditioneitol (DTT) ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) (Sigma)  
 Dodecil sulfato sódico (SDS) ( $C_{12}H_{25}O_4SNa$ ) (Sigma)

**E**

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

**F**

Fenol ( $C_6H_5OH$ ) (Merck)  
 Formaldehído (HCHO) (Merck)  
 Fosfatasa alcalina de timo de ternera (CIAP) (Invitrogen<sup>TM</sup>)  
 Fosfato monosódico diácido ( $NaH_2PO_4$ ) (Panreac)  
 Fosfato disódico monoácido ( $Na_2HPO_4$ ) (Panreac)  
 Fosfato sódico ( $Na_3PO_4$ ) (Sigma)  
 Fosfato potásico monobásico ( $KH_2PO_4$ ) (Sigma)

**G**

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

**H**

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



Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (Sigma)

Hidrolizado de caseína (NZ amina) (Sigma)

Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)

Hidróxido 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-tiogalactósido (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-Triptófano (Sigma)

L-Valina (Sigma)

L-Uracilo (Sigma)

## M

Maltosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>O) (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<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) (Sigma)

Metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Panreac)

4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>) (MUG) (Sigma)

Molibdato de sodio dihidratado (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) (Sigma)

Myo-inositol (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma)

## N

Neoxantina

Nitrato amónico (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) (Sigma)

Nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) (Sigma)

Nitrato potásico ( $\text{KNO}_3$ ) (Panreac)

## O

$\beta$ -octil glucósido ( $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$ ) (Sigma)

Óxido de deuterio (agua pesada) ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Sigma)

## P

Parafina (Paraplast Plus; Sherwood Medical)

Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Merck)

Piridoxina (vitamina B6) ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) (Sigma)

Polietilenglicol 3350 (PEG-3350) (Panreac)

Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) (Panreac)

Progel Tris-Glycin 12% 1.0 mm (ANAMED)

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

## R

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

Reactivo de Schiff ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) (Merck)

Rifampicina ( $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$ ) (Duchefa)

RNasa OUT<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>)

RNasa pancreática (Pharmacia)

Roti Load (Roth)

## S

Sacarosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) (Sigma)

Sepharose GST-Bind<sup>TM</sup> Resin (Novogen)

Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma)

Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma)

Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Panreac)

Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma)

Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Panreac)

Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma)

SYBR-Green I (Molecular Probes)

## T

Tetrahidrato de cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma)

Tiamina (vitamina B1) ( $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \times \text{HCl}$ ) (Duchefa)

Tricina ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$ ) (Sigma)

Titriplex (Merck)

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

Tritón X-100 (Sigma)

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

## V

9-*cis*-violaxantina

## X

*Xho*I (NEB)

Xilen-cianol FF (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Na) (Sigma)

**Y**

Yoduro potásico (KI) (Panreac)

Yoduro sódico (NaI) (Sigma)

**Z**

9-*cis*-zeaxantina

### I.1.2. Antibióticos utilizados

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

**Tabla 1: Antibióticos empleados en este trabajo.**

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

### I.1.3. Kits de biología molecular

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

*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 (Fermentas)

*GeneJET* PCR Purification Kit (Fermentas)

*GeneJET* Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

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

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

*Marathon™ cDNA Amplification Kit (BD Biosciences)*  
*One Library Efficiency DH5α Chemically Competent Cells (Invitrogen™)*  
*One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen™)*  
*pGEM®-T Easy Vector System I (Promega)*  
*Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)*  
*QIAGEN® Plasmid Mini Kit (Qiagen)*  
*QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen)*  
*RNeasy® Mini Kit (Qiagen)*  
*SsoAdvanced™ SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad)*  
*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)*

## I.2. Material biológico

### I.2.1. Material vegetal

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

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

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

#### **I.2.1.1. Retirada de aquenios y tratamiento con auxinas**

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

#### **I.2.1.2. Frutos inyectados**

##### ***Tratamiento con NDGA exógeno***

Con el objetivo de bloquear la biosíntesis de ABA, se inyectaron frutos de fresa (*Fragaria × ananassa* “Elsanta”) en estadios verde-blanco con ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Creelman *et al.*, 1992). El NDGA es un inhibidor de la enzima 9-*cis*-epoxycarotenoide dioxygenasa (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  $\mu\text{M}$ , 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### ***Tratamiento con GA<sub>3</sub> y PAC***

Se inyectaron frutos de fresa (*Fragaria*  $\times$  *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, bloqueándola, en la síntesis de giberelinas. Los frutos de fresa seleccionados para el experimento fueron inyectados con 1-2 ml de PAC 100  $\mu\text{M}$ , GA<sub>3</sub> 100  $\mu\text{M}$  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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para los experimentos con plantas, se emplearon plantas de fresa (*Fragaria*  $\times$  *ananassa* “Chandler”) mantenidas en cultivo *in vitro* micropropagado en medio N30K suplementado con kinetina 2.2 mM (Barceló *et al.*, 1998). Las plantas fueron tratadas de forma independiente con GA<sub>3</sub> 100  $\mu\text{M}$  y PAC 100  $\mu\text{M}$  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.

#### **1.2.1.3. Tratamiento de estrés hídrico**

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

Los frutos seleccionados para el experimento se mantuvieron con los pedicelos al aire mientras que los frutos control se mantuvieron con los pedicelos sumergidos en medio MS (Apéndice 23) 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y bajo una irradiancia de  $120\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$  proporcionada por lámparas Osram Fuora (München, Germany). A las plantas control se les mantuvo el riego diario mientras que a las plantas problema se les retiró hasta presentar un fenotipo claro de estrés hídrico. Llegado este momento se recolectaron frutos, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de su ARN.

### 1.2.2. Estirpes bacterianas

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

***Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS** (Invitrogen<sup>TM</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 (*Cam*).

***Escherichia coli* BL21 (TOP10)** (Invitrogen<sup>TM</sup>): *F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ 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>TM</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* LBA4404** (Hoekema *et al.*, 1983): *TiAch5 Rif<sup>r</sup> Str<sup>r</sup> Thi<sup>+</sup>*.

Estirpe bacteriana resistente a rifampicina y empleada para la transformación y obtención de plantas transgénicas de fresa. Contiene el plásmido *Ti* desarmado *pAL4404* que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina pero que no porta los genes de síntesis de opinas. No obstante, se mantiene intacta la región *vir* que aporta en trans las funciones de virulencia necesarias para la transferencia del T-DNA del vector binario correspondiente al genoma de la planta.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101** (Koncz y Schell, 1986): *pTiC58ΔT-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): *EHA101pTibO542 ΔT-regionMop+*. 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

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

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

#### Apéndice 1: Composición de los medios de cultivo bacterianos

##### LB (Luria-Bertani) (Autoclave)

Bacto-triptona 10 g/l  
 Extracto de levadura 5 g/l  
 NaCl 10 g/l  
 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)



### I.2.2.2. Conservación de las estirpes bacterianas

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

### I.2.3. Estirpes de levaduras

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

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

#### I.2.3.1 Condiciones de cultivo de las estirpes de levaduras

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

#### Apéndice 2: Composición de los medios de cultivo de levaduras

##### **SD glu** (Autoclave)

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 6,7 g/l

D-glucosa (Sigma) 20 g/l

H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar el volumen final.

##### **SD glu sólido** (Autoclave)

Medio SD glu

Agar 2% (p/v)

<b>Apéndice 3: 10 x “Drop-out solution”</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Peso (mg/l)</b>	<b>Referencia Sigma</b>
L-Isoleucina	300	I 2752
L-Valina	1500	V 0500
L-Adenina	200	A 9126
L-Arginina HCl	200	A 5131
L-Histidina HCl Monohidrato	200	H 8125
L-Leucina	1000	L 8000
L-Lisina HCl	300	L 5626
L-Metionina	200	M 9625
L-Fenilalanina	500	P 2126
L-Treonina	2000	T 8625
L-Triptófano	200	T 0254
L-Tirosina	300	T 3754
L-Uracilo	200	U 0750

### I.2.3.2 Conservación de las estirpes de levaduras

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

### I.2.4. Vectores de clonación en *E. coli*.

**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 mediante la endonucleasa de restricción *EcoRV*. Además, la posición 3' de los extremos romos resultantes de la actuación de la restrictasa han sido modificados químicamente adicionando dos restos de deositimidina. Estos residuos incrementan la eficiencia de la ligación de los productos de PCR debido a que numerosas ADN polimerasas termoestables añaden sistemáticamente un residuo de deosiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados, independientemente de la secuencia del ADN utilizado como molde.

El sitio de inserción se encuentra flanqueado por un lugar de clonación múltiple que contiene dianas únicas para 12 endonucleasas de restricción diferentes y puntos de corte duplicados, a ambos lados del lugar de inserción, para tres restrictasas distintas. En los extremos del mismo, aparecen cuatro secuencias promotoras diferentes (cebadores *Reverse (M13)*, *Forward (M13)*, *T3* y *T7*). El sitio de clonación múltiple interrumpe la secuencia génica del fragmento aminoterminal  $\alpha$  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.

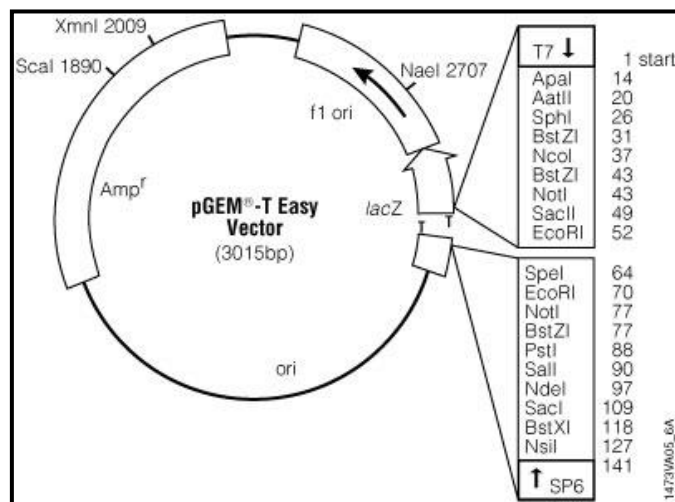


Figura 2: Vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy

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

Junto al sitio de subclonaje del producto de PCR en el plásmido, existen los sitios *attL Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). Ello 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>TM</sup>221** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>TM</sup>). Este vector (Figura 3B) se empleó para la clonación de fragmentos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Está diseñado para generar sitios *attL* que flanqueen al producto de PCR subclonado dentro de él y así poder ser empleado posteriormente como *Entry vector* en la recombinación basada en la metodología *Gateway<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.

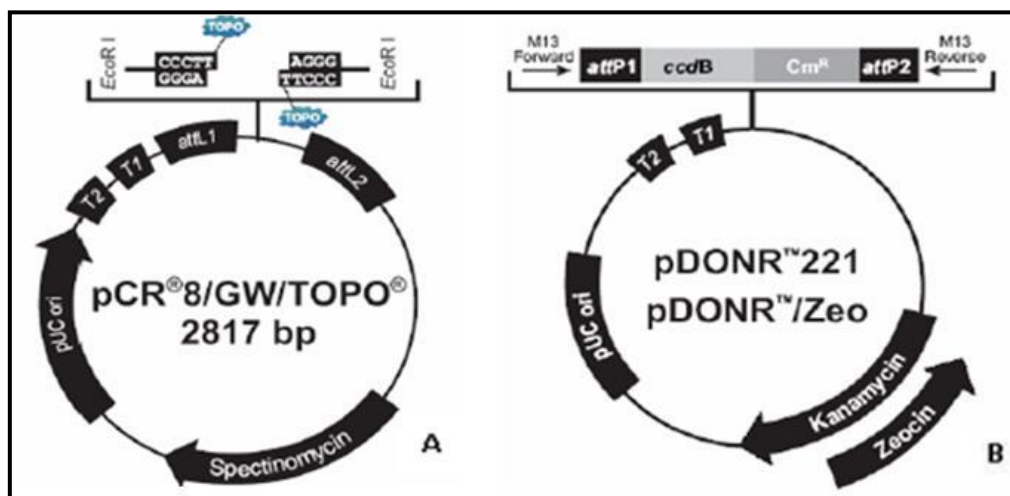


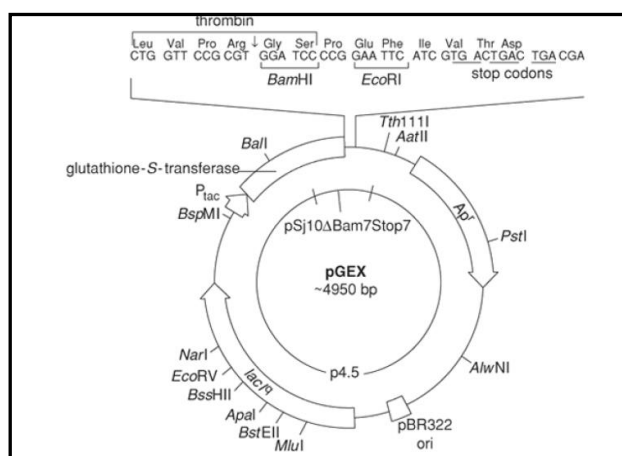
Figura 3: A) Vector de clonación pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>. B) Vector de clonación pDONR<sup>TM</sup>221

### 1.2.5 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 *tac* 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 *Escherichia 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 nos permite la captura específica de la proteína y la eliminación de impurezas presentes en la muestra mediante varios lavados sucesivos. Este proceso de purificación preserva tanto la antigenicidad como la actividad de la proteína lo que facilita su posterior análisis. Si es necesario, la 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.



**Figura 4: Vector de expresión pGEX-4T-1**

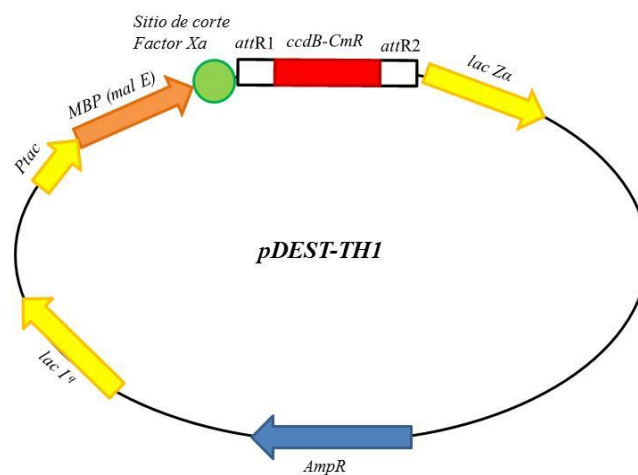
En cualquier caso, las construcciones pGEX-4T-1-ADNc obtenidas se transforman preferentemente en la estirpe bacteriana *E.coli* BL21 (DE3) pLysS, resistente a cloranfenicol (Cam). Además, la selección de células de *E. coli* portadoras de este vector se hace en presencia de ampicilina. Por otra parte,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

**pDEST-TH1** (Cedido por el Dr. José Manuel Franco, Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC) (Figura 5). Es un vector de expresión de proteínas en bacterias que se emplea como *Destination vector* en la metodología *Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). 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).

Este vector es una modificación del vector pMal-p2X en el que se han introducido los sitios de recombinación *attR* y el gen *ccdB* situado en la región delimitada por dichos extremos (*attR1-ccdB-Cm<sup>R</sup>-attR2*). Además, contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol junto al gen *ccdB*, por lo que la presencia de este antibiótico en el medio favorece la estabilidad

del gen *ccdB* en el ADN plasmídico. Para la selección en células de *E. coli*, este vector contiene además un gen marcador de resistencia al antibiótico ampicilina.

Este vector contiene además el gen de fusión de unión a la maltosa (*MBP*) en el extremo amino terminal del gen de interés, que lo convierte en un sistema muy versátil de expresión, purificación y detección de proteínas producidas en *E. coli*. El sistema se basa en la expresión inducible de altos niveles de proteína recombinante fusionada a la MBP en el extremo amino terminal. Posteriormente, la proteína de fusión obtenida se purifica a partir de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa, lo que nos permite la captura específica de la proteína y la eliminación de impurezas presentes en la muestra mediante varios lavados sucesivos. Este proceso de purificación preserva tanto la antigenicidad como la actividad de la proteína lo que facilita su posterior análisis. Si es necesario, la MBP se puede eliminar mediante digestión con la proteasa Factor Xa y liberar así la proteína recombinante de interés para usos posteriores.



**Figura 5: Vector de expresión pDEST-TH1**

**pDEST<sup>TM</sup>22** (*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 completa de ADNc 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 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 al triptófano.

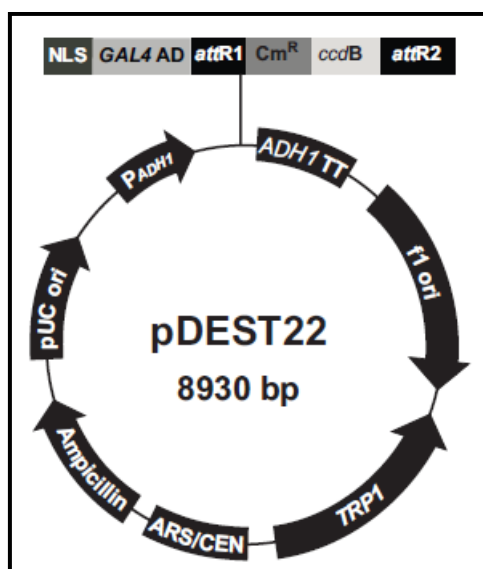


Figura 6: Vector pDEST<sup>TM</sup>22

**pDEST<sup>TM</sup>32** (*Gateway<sup>®</sup> Vector*, Invitrogen<sup>TM</sup>) (Cedido por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding) (Figura 7). 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 de ADNc 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 a la leucina para la selección en levaduras *S. cerevisiae* cepa PJ69-4a.

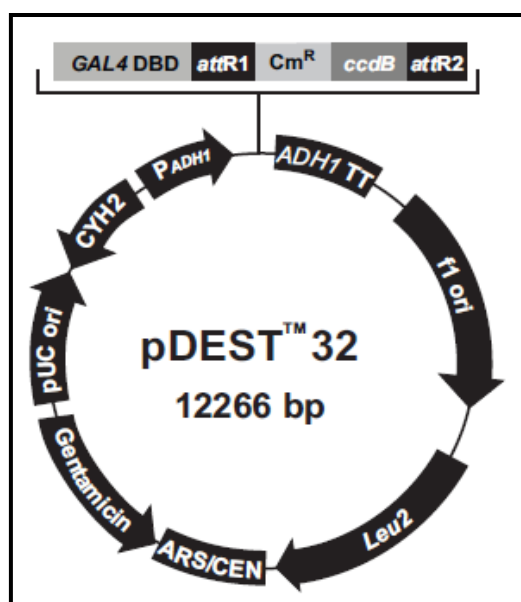


Figura 7: Vector pDEST™32

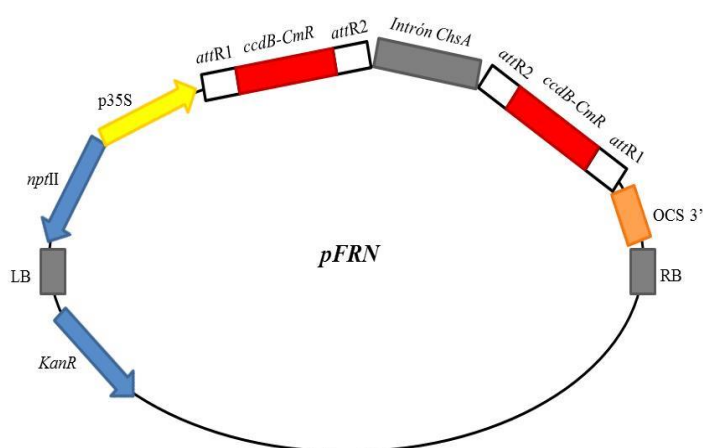
### I.2.6. Vectores binarios

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

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



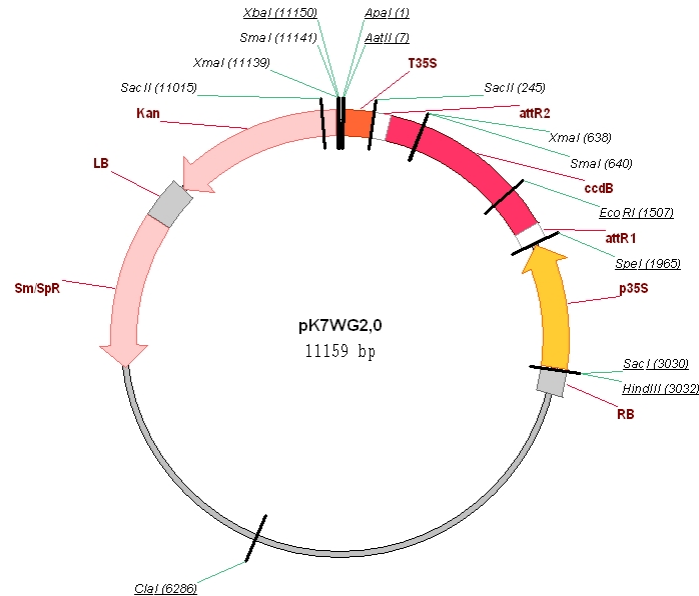
Este vector incluye además dos genes *ccdB* flanqueados por cada pareja de extremos *attR* (*attR1-ccdB-CmR-attR2* y *attR2-ccdB-CmR-attR1*) (Bernard y Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1993). La proteína codificada por este gen interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, inhibiendo el crecimiento de la mayoría de estirpes de *E. coli* (ej. DH5 $\alpha$  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 II.10). Además, contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol junto al gen *ccdB*, por lo que la presencia de este antibiótico en el medio favorece la estabilidad del gen *ccdB* en el ADN plasmídico. Para la selección en bacterias y plantas, este vector contiene además un gen marcador de resistencia al antibiótico kanamicina.



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

**pK7WG2.0** (Plant Systems Biology, VIB) (Karimi *et al.*, 2002) (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. 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.

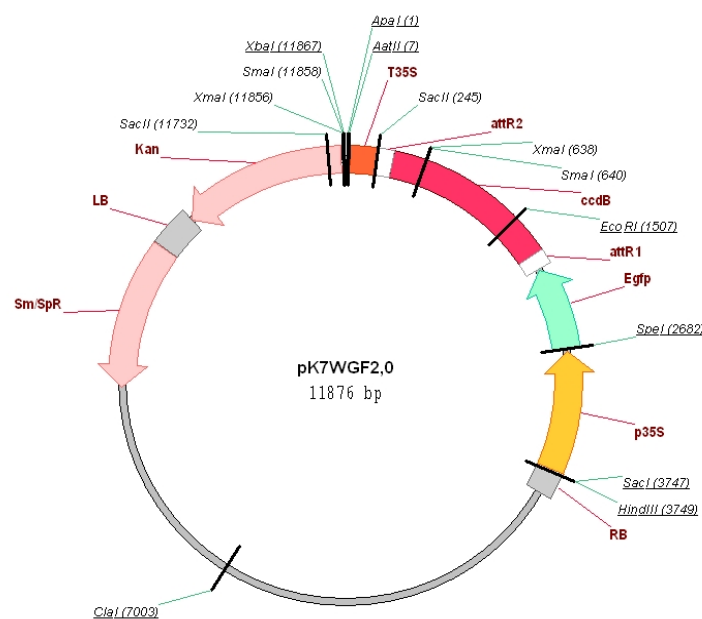
Para su selección en bacterias y plantas, este vector contiene además un gen marcador de resistencia a espectinomicina/estreptomicina y a kanamicina respectivamente.



**Figura 9: Vector de expresión pK7WG2.0**

**pK7WGF2.0** (Plant Systems Biology, VIB) (Karimi *et al.*, 2002) (Figura 10). Este vector binario presenta las mismas características que el vector pK7WG2.0 explicado anteriormente además de poseer, 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 se empleó para estudios de localización subcelular de los genes *FaPRE1* y *FaEOBII* mediante su expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

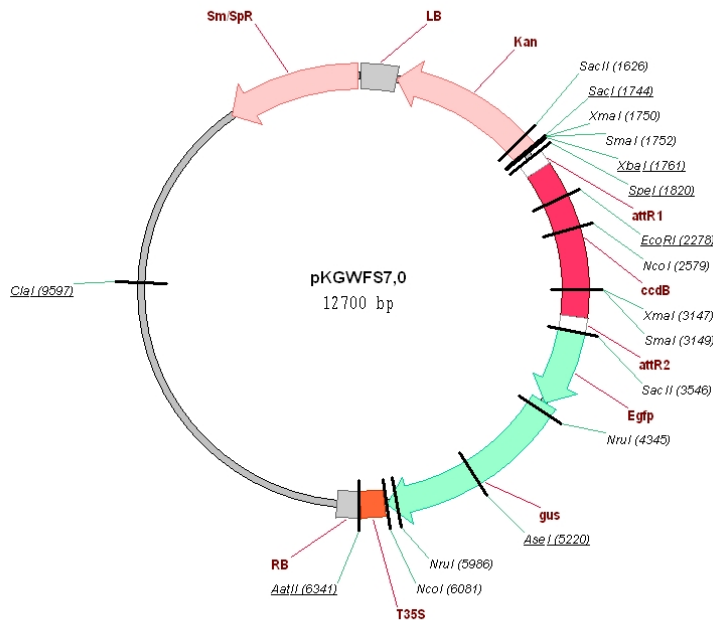


**Figura 10: Vector de expresión pK7WGF2.0**

**pKGWFS7.0** (Plant Systems Biology, VIB) (Karimi *et al.*, 2002) (Figura 11). 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 estudios de promotores de interés. Como todos los vectores *Gateway*, posee los sitios de recombinación específicos *attR* que permiten el subclonaje de cualquier fragmento de ADN mediante la reacción *in vitro* de la *LR clonase*<sup>™</sup>. Los fragmentos se clonan en una orientación dirigida y marco de lectura predefinido. Este vector también posee el gen *ccdB* situado en la región delimitada por los extremos *attR* (*attR1-ccdB-Cm<sup>R</sup>-attR2*). Además, presenta los genes reporteros *Egfp* y *gus* fusionados al extremo carboxilo terminal y en el mismo marco de lectura que el promotor en estudio.

Para la selección en células de *E.coli*, este vector contiene un gen marcador de resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomicina. Para la selección en plantas transgénicas, contiene un gen marcador de resistencia a kanamicina.

Este vector se empleó para estudios de trans-activación de promotores mediante su expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.



**Figura 11: Vector de expresión pKGWFS7.0**

## II. MÉTODOS

### II.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

#### II.1.1. Extracción de ARN

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

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

Las soluciones acuosas fueron tratadas con DEPC a una concentración final de 0,1 % (v/v). Tras una agitación vigorosa, se dejaron reposar en una campana de extracción de gases durante 16 horas y posteriormente se esterilizaron en autoclave. Los tampones que contenían Tris 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.

##### II.1.1.2. Obtención y purificación de ARN

###### II.1.1.2.1. Preparación de solventes orgánicos

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

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

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

La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en Asif *et al* (2000). El tejido congelado (1 g) 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 (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1*). El ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso.

**Apéndice 4: Soluciones utilizadas para la obtención y purificación de ARN****Tampón de extracción cloroformo:alcohol isoamílico (aptdo. II.1.1.2.2.)**

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

## II.1.2. Extracción de ADN

### II.1.2.1. Obtención y purificación de ADN plasmídico

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

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

### II.2.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

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

En el caso de muestras de ARN, paralelamente se realizaron medidas a 230 y 280 nm para determinar el grado de contaminación de la muestra por polisacáridos y proteínas respectivamente. La relación  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{230\text{nm}}$  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.

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

## II.2.2. Separación electroforética de ácidos nucleicos

### II.2.2.1. Electroforesis de ADN

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

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

Con objeto de estimar la cantidad y/o tamaño de las moléculas de ADN, en los geles siempre se incluyó un patrón de ADN de concentración y tamaños moleculares conocidos. Los marcadores de peso molecular más utilizados fueron el ADN de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III (Pharmacia) y *1 Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>).

### II.2.2.2. Electroforesis de ARN

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

La visualización de las moléculas de ARN se consiguió por la exposición del gel correspondiente a luz ultravioleta de rango de emisión entre 260 y 302 nm (onda cortamedia).

Se consideró que el ARN presentaba una integridad adecuada cuando se observaron al menos dos bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S, siendo óptima una relación de intensidad dos veces superior para el ARNr 28S con respecto al ARNr 18S.

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

#### **Apéndice 5: Soluciones empleadas en la electroforesis de ácidos nucleicos**

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

##### **Tampón TBE [1X]**

Tris 44 mM  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 90 mM  
EDTA-Na<sub>2</sub> 2,2 mM  
Ajustar pH 8

##### **Tampón de carga [10X]**

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

## **II.3. Manipulación de moléculas de ADN**

### **II.3.1 Purificación de fragmentos de ADN**

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

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

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

El uso del sistema *Fermentas GenJET PCR Purification Kit* (Fermentas) permitió una eficaz purificación de fragmentos de ADN presentes en soluciones acuosas (productos de PCR,



fragmentos resultantes de digestiones con endonucleasas, moléculas marcadas, etc). El proceso se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones suministradas por la casa comercial (<http://www.thermoscientific.com>). El ADN se recuperó directamente en H<sub>2</sub>O estéril.

### II.3.2. 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).

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

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

#### **Apéndice 6: Mezcla de digestión enzimática**

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

### II.3.4. Ligación de moléculas de ADN

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

#### *Desfosforilación del vector*

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

#### *Reacción de ligación*

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

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

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

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

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

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

#### **Apéndice 7: Reacción de ligación**

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

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

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

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

### **II.3.5. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN**

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

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

Los cebadores universales (Tabla 2) se emplearon para la amplificación y, en algunos casos, para la secuenciación de fragmentos de ADN incluidos en los vectores pGEM®-T Easy, pGEX-4T-1, pCR®8/GW/TOPO®, pDONR™221 y pDEST-TH1 (*Materiales y Métodos, apartados*

I.2.4. y I.2.5). La temperatura de anillamiento siempre fue 55 °C y el programa de PCR empleado el que se detalla en la Tabla 5.

**Tabla 2; Cebadores universales empleados.**

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

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

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

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

**Tabla 3; Cebadores específicos empleados en la comprobación de construcciones**

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

Los oligonucleótidos empleados en qRT-PCR (Tabla 4) fueron diseñados específicamente a partir de la secuencia conocida de cada uno de los genes, generalmente en el extremo 3'. El amplicón obtenido fue siempre entre 100 y 200 pb, tamaño recomendado para que la

concentración de reactivos disponibles en la mezcla no sea limitante, no viéndose afectada ni la reacción de PCR ni la emisión de fluorescencia (*Materiales y Métodos, apartado II.6.3*).

Tabla 4: Cebadores específicos empleados en qRT-PCR, amplificación, clonación y secuenciación de fragmentos de los genes de secuencia conocida indicados.

Gen	Cebador	Secuencia específica	Tamaño de amplicón
<b>NDR1</b>	<i>NDR1 up</i> <i>NDR1 low</i>	5'- CGG AAT TGT GGT CGG AGA AAA CGC TGT -3' 5'- TCC TCA TGG ATT GCT CCC CCT TTC ATT -3'	149 pb
<b>FaRIB413</b>	<i>413-A</i> <i>413-B</i>	5'- ACC GTT GAT TCG CAC AAT TGG TCA TCG -3' 5'- TAC TGC GGG TCG GCA ATC GGA CG -3'	151 pb
<b>Famyb10</b>	<i>Famyb10 up</i> <i>Famyb10 low</i>	5'- TGC CGG ACG ATT GCC AGG AAG -3' 5'- TGA AGG TCC GTG GTC GA -3'	129 pb
<b>Famyb10</b>	<i>GWFFamyb10 up</i> <i>GWFFamyb10 low</i>	5'- AGA TGA CTA GAT GAT TGC TTG CCG -3' 5'- TGC CGG ACG ATT GCC AGG AAG -3'	407 pb
<b>Famyb10</b>	<i>FLFamyb10 up</i> <i>FLFamyb10 low</i>	5'- ATG GAG GGT TAT TTC GGT GTG AGA AA -3' 5'- TCA TAC GTA GGA GAT GTT GAC TAG -3'	708 pb
<b>PAL</b>	<i>FaPAL fw</i> <i>FaPAL rv</i>	5'- GAT GCA AAG GCT AAG GCA AG -3' 5'- AGC CCT AAC GCT CTC AAC CT -3'	176 pb
<b>C4H</b>	<i>FaC4H fw</i> <i>FaC4H rv</i>	5'- TGC CCT TGG CTT CAT GAC T -3' 5'- GCT TGA CAC TAC GGA GAA AGG -5'	136 pb
<b>4CL</b>	<i>4CL-2</i> <i>4CL-3</i>	5'- GAT GAC GGA GGC GAC CCA TTT GAT G -3' 5'- GGC ACG ATT TGA TCA CCT CCA CGG -3'	330 pb
<b>CHI</b>	<i>FaCHI fw</i> <i>FaCHI rv</i>	5'-GTCAATGTACCCTATATCACC-3' 5'-GCTCAGTTTCATGCCTTGAC-3'	135 pb
<b>CHS</b>	<i>FaCHS fw</i> <i>FaCHS rv</i>	5'- GCC TTT GTT TGA GCT GGT CT -3' 5'- CCC AGG AAC ATC TTT GAG GA -3'	154 pb
<b>FaCCR</b>	<i>FaCCR up</i> <i>FaCCR low</i>	5'- ACG TCT TCA ATC GGT GCC GTC TAC A -3' 5'- CTG GCG TGA TGG TTG GTT GGA G -3'	198 pb

Gen	Cebador	Secuencia específica	Tamaño de amplicón
<b>FaANR</b>	<i>FaANR up</i> <i>FaANR low</i>	5' - CCT GAA TAC AAA GTC CCG ACT GAG - 3' 5' - GTA CTT GAA AGT GAA CCC CTC CTT C - 3'	98 pb
<b>ANS</b>	<i>ANS fw</i> <i>ANS rv</i>	5' - GAC TTG TCC ATT TGG CCT C - 3' 5' - CCC CCT CAG TTC CTT AGC ATA CTC - 3'	102 pb
<b>Fraa-2</b>	<i>Fraa-2 fw</i> <i>Fraa-2 rv</i>	5' - CGT GGA GAT CAA GGA AGA GC - 3' 5' - GGA ACA TCA GCG GAA CAA AT - 3'	153 pb
<b>UFGT</b>	<i>UFGT-A</i> <i>UFGT-B</i>	5' - GGC TGC ACT TGC TGG TGG TTC TAC - 3' 5' - GCT TCA CCA GAT GGG ACA GAT GC - 3'	160 pb
<b>FLS</b>	<i>FLS up</i> <i>FLS low</i>	5' - AGT GCA ACT TCT CCT TTC TGA TAG C - 3' 5' - CAT GAG GCA CAA TGG GGA CTC TAA - 3'	162 pb
<b>FaNCED1</b>	<i>NCED1 up</i> <i>NCED1 low</i>	5' - GAG CTT GAA GAG TGT GTT GTC CGA AA - 3' 5' - CGG TTC AGC AAT GGC GAG ATA AGC ATA - 3'	172 pb
<b>FaNCED1</b>	<i>GWNCED1 up</i> <i>GWNCED1 low</i>	5' - CGG TGC CGC CAG CTA CGC AT - 3' 5' - GTG GGG GCC GCC AGA GGG AT - 3'	477 pb
<b>FaNCED1</b>	<i>FLNCED1 up</i> <i>FLNCED1 low</i>	5' - ACC TCA CCA CCT CTC CAC CAC C - 3' 5' - CCA GGA GAA TCC GGG GAC CTG T - 3'	1916 pb
<b>FaNCED1</b>	<i>NCED1prot fw</i> <i>NCED1prot rv</i>	5' - CTG AAT TCA GCT TCA CCA AAA GAT - 3' 5' - GCC TTG AAA AAC CAG GCA GAG CTC TAG CT - 3'	1747 pb
<b>FaPRE1</b>	<i>PRE1 up</i> <i>PRE1 low</i>	5' - ATA AGC TTT GGC AAA CGC GAG GTT - 3' 5' - GAT ACC TGA TCG GAG CGC CTG T - 3'	223 pb
<b>FaPRE1</b>	<i>GWPRE1 up</i> <i>GWPRE1 low</i>	5' - GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA ACG AGG CTC GCT ACA TAA TAT ACT CTA GCT TGC TCA T - 3' 5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA CTA GTG CAA GTC CTT TTT ATT AAT C - 3'	625 pb
<b>FaPRE1</b>	<i>FLPRE1 up</i> <i>FLPRE1 low</i>	5' - AAG GGT ACC ACT ACA TAA TAT ACT CTA GCT TGC TCA - 3' 5' - CCT GGA TCC CTA GTG CAA GTC CTT TTT ATT AAT C - 3'	626 pb

<b>Gen</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia específica</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>
<b>FaPRE1</b>	<i>PRE1-silenc up</i> <i>PRE1-silenc low</i>	5' - TTC TAT CTC AGA GTT TGC TTC T - 3' 5' - TTG ATG ACC TTC CGC TAG ACA T - 3'	218 pb
<b>FaPRE1</b>	<i>attB-PRE1-up</i> <i>attB-PRE1-low</i>	5' - GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AAC AAT GTC TAG CGG AAG GTC ATC AAG CCA GTC - 3' 5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA CTG CAT AAT CAA GCT CCT AAA AAT GGC - 3'	282 pb
<b>FaEOBII</b>	<i>EOBII up</i> <i>EOBII low</i>	5' - AGT GAG AAA AGG GCC GTG GAC CA - 3' 5' - ACC GGC AGA TTT GGC AAG GGA G - 3'	103 pb
<b>FaEOBII</b>	<i>GWEOBII up</i> <i>GWEOBII low</i>	5' - AGG GCC GTG GAC CAT GGA AGA GG - 3' 5' - CGC CGT CGG GGC GCA TAG AGG - 3'	448 pb
<b>FaEOBII</b>	<i>EOBII-silenc up</i> <i>EOBII-silenc low</i>	5' - TGG AGA ACC CGA ATC CAA AAG CAC A - 3' 5' - ACC AGA GAT CCT CCA TGC TCC AGT - 3'	268 pb
<b>FaEOBII</b>	<i>attB-EOBII-up</i> <i>attB-EOBII-low</i>	5' - GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AAC AAT GGA TAA AAA ACC ATG CAA TTC ATC - 3' 5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTC TCC ATT TAG TAA CTG CAT AGA CC - 3'	624 pb
<b>FaCAD</b>	<i>pCAD up</i> <i>pCAD low</i>	5' - ACT CCG ACG TTT GTT GAG AGA - 3' 5' - TCT CGA TCT GTG GCA GAT TCT T - 3'	2637 pb
<b>FaCAD</b>	<i>pCAD-int up</i> <i>pCAD-int low</i>	5' - TGT AAC CCA CCG TAG CCC GTG TGT - 3' 5' - TGG CAG ATT CTT AAC TGA CGA TTT - 3'	434 pb
<b>FaCAD</b>	<i>FaCAD up</i> <i>FaCAD low</i>	5' - GTG GGA GAC AGA GTC GGT GTT G - 3' 5' - CAT CAA GAG GCA AGT TGT CTG G - 3'	207 pb
<b>FaEGS2</b>	<i>FaEGS2 up</i> <i>FaEGS2 low</i>	5' - ATG CTG TTG AGC CCG CGA AGA CGA C - 3' 5' - TCC CTA GGA GGG GCA GTG GCT CCG - 3'	160 pb
<b>FaEGS2</b>	<i>FLEGS2 up</i> <i>FLEGS2 low</i>	5' - ATGGCAGAAACCAAATCCAAGATTCTTATCG - 3' 5' - TCAGATAAACTGGTTGAGGTACTC - 3'	930 pb
<b>FaEGS2</b>	<i>FaEGS2RNAiGWFw</i> <i>FaEGS2RNAiGWRv</i>	5' - TCGTCGGAAGCACC GGCTTCATTGG - 3' 5' - AGGGCAGTGGCTCCGGGCTGA - 3'	488 pb



<b>Gen</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia específica</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>
<b>FaHMGCoA-Red</b>	<i>FaHMGCoA-Red up</i>	5' - GCC TCC GAC GCG CTG CCG TT - 3'	107 pb
	<i>FaHMGCoA-Red low</i>	5' - GCG GAT CTT CTC GCG CCA ACG GTG - 3'	
<b>FaDXPs</b>	<i>FaDXPs up</i>	5' - AGA TGG TCC CAC CCA CTG TGG AGC A - 3'	119 pb
	<i>FaDXPs low</i>	5' - ACT GCT GCT GTG GCG ACC ATG TGC A - 3'	
<b>FaPhytoSynthase</b>	<i>FaPhytoSynthase up</i>	5' - TCG TCG CTG GAC TCG CTG ACC GAG - 3'	157 pb
	<i>FaPhytoSynthase low</i>	5' - TTG CCA TAA CGG TTG GCA TGC CCC - 3'	
<b>FaNSY</b>	<i>FaNSY up</i>	5' - TGG AAA ACC AAA TGG AGA CGC GCC A - 3'	122 pb
	<i>FaNSY low</i>	5' - CGT GTG TGC TGG ACC TTC CCG CA - 3'	

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

Concretamente, los cebadores específicos FLNCED1 diseñados a partir de la secuencia conocida del gen *FaNCED1* fueron empleados para la obtención del ADNc completo correspondiente a dicho gen (*Materiales y Métodos, apartado II.7.1*); los cebadores NCED1prot (*Materiales y Métodos, apartado II.7.2.*) se diseñaron para la obtención de la construcción pGEX-4T-1-*FaNCED1*; y los cebadores GWNCED1 se emplearon para la generación de la construcción pFRN-*FaNCED1* (*Materiales y Métodos, apartado II.10*). Por otra parte, para la generación de las construcciones pFRN-*FaMYB10* y pFRN-*MYB1* (*Materiales y Métodos, apartado II.10*) se diseñaron los cebadores específicos GWFamyb10 y GWFamyb1 respectivamente. Los cebadores específicos attB-PRE1 y attB-EOBII, diseñados a partir de la secuencia conocida de los genes *FaPRE1* y *FaEOBII* respectivamente, fueron empleados para la obtención del ADNc completo de dichos genes y la obtención de las construcciones pDEST-TH1-*FaEOBII*, pDEST<sup>TM</sup>22-*FaPRE1*, pDEST<sup>TM</sup>32-*FaPRE1*, pK7WGF2-*FaPRE1* y pK7WGF2-*FaEOBII*. Los cebadores FLPRE1 y GWEOBII se emplearon para la generación de las construcciones pFRN-*FaPRE1* y pFRN-*FaEOBII*, respectivamente. Paralelamente, para la generación de la construcción pK7WG2-*FaPRE1* fue diseñada la pareja de cebadores GWPRE1. Por otro lado, los cebadores pCAD, diseñados a partir de la secuencia conocida del promotor del gen *CAD*, fueron empleados para el aislamiento de la secuencia correspondiente a dicho promotor y la posterior obtención de la construcción pKGWFS7-*pCAD*.

En general, las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción incluyó:

<b>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

En todas las amplificaciones rutinarias, salvo excepciones, se utilizó el mismo programa básico recogido en la Tabla 5. 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 5. Programa para la amplificación por PCR de fragmentos de ADN.**

<b>Temperatura</b>	<b>Duración</b>	<b>Repeticiones</b>
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

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

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

##### **Tampón de PCR [10X]**

Tris-HCl pH 9 100 mM

KCl 500 mM

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

### II.3.6. Secuenciación

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

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

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

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

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

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

#### **Apéndice 10: Soluciones empleadas en la preparación de células competentes**

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

<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	

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 pGEX-4T-1 y pDEST-TH1 (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*). En el caso de la transformación de células de *E.coli* con los vectores plasmídicos del sistema Gateway, siempre se emplearon las células competentes comerciales *One Shot TOP10 Chemically competent E. coli* (Invitrogen<sup>TM</sup>) (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*).

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

En todos los casos, salvo cuando usamos las células *One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen<sup>TM</sup>) comerciales (dispensadas en alícuotas de 50  $\mu$ l), la muestra de ADN (~45 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 rápida 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 II: Soluciones empleadas en la obtención de células competentes y transformación de *E. coli*.

<b>Medios LB líquido y LB sólido</b> Ver Apéndice I	<b>Medio SOC (Autoclave)</b> 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
--------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

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

Se creció una colonia aislada de *A. tumefaciens* (LBA4404, GV3101 o AGL0) a 28 °C en 50 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes según la cepa (*Materiales y Métodos, apartado I.2.2*). Una vez alcanzada una  $DO_{600}$  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  $CaCl_2$  20 mM frío. La suspensión celular obtenida se distribuyó en alícuotas de 200  $\mu$ l.

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

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

#### **II.4.5. Selección de transformantes bacterianos positivos**

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

##### **II.4.5.1. Selección por antibióticos**

Inicialmente, la selección de los transformantes positivos se realizó en medio selectivo LB sólido suplementado con los antibióticos a los que confería resistencia el vector introducido. En el caso del vector plasmídico pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> y los vectores binarios pK7WG2.0, pK7WGF2.0 y pKGWFS7.0 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  $\mu$ g/ml). Cuando los vectores empleados en la transformación fueron pGEM<sup>®</sup>-T Easy, pGEX-4T-1, pDEST-TH1 o pDEST<sup>™</sup>22, la selección de los transformantes positivos se realizó en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/ml), mientras que los transformantes

portadores del vector pDONR<sup>TM</sup>221 y del vector binario pFRN se seleccionaron en presencia de kanamicina (50 µg/ml), y los transformantes con el vector pDEST<sup>TM</sup>32 se seleccionaron en presencia de gentamicina (25 µg/ml) (*Materiales y Métodos, apartados I.2.4, I.2.5 y I.2.6*).

Las cepas de *A. tumefaciens* empleadas presentan además, resistencia a rifampicina (AGLO); rifampicina, gentamicina y kanamicina (GV3101); o rifampicina y espectinomicina/estreptomicina (LBA4404). Así, la selección de transformantes positivos de *Agrobacterium* se realizó añadiendo al medio simultáneamente los antibióticos a los que las cepas empleadas eran resistentes y el antibiótico adecuado en función del vector introducido en ellas (*Materiales y Métodos, apartado I.2.2*).

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

En el caso de las construcciones derivadas del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (que porta como marcadores el gen de resistencia a ampicilina y el gen de la  $\beta$ -galactosidasa) (*Materiales y Métodos, apartado I.2.4*), la selección de transformantes positivos se realizó sembrando las células transformadas en placas de LB sólido suplementadas con ampicilina (100 µg/ml), 40 µl de solución de IPTG (0,1 M en H<sub>2</sub>O, esterilizado por filtración y almacenado a -20 °C) y 40 µl de solución de X-gal (20 % p/v en N-N-dimetilformamida, almacenado a 4 °C), y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Una vez crecidas las colonias, se seleccionaron aquellas que presentaron un color blanco, lo que significaba que se había producido la inserción del fragmento de ADN exógeno en el sitio de clonación múltiple del vector provocando la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, e impidiendo así la síntesis correcta de la enzima que capacitaría a la bacteria para hidrolizar el X-gal y producir el compuesto (5-bromo-4-cloro-3-indol) que colorea la colonia de azul.

#### **II.4.6. Identificación de transformantes positivos**

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

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

#### II.4.6.2. Identificación de transformantes positivos mediante PCR

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

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

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

Las cepas de levaduras PJ69-4a y PJ69-4 $\alpha$  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 LiAc 100 mM. Se dejaron incubar durante 5 minutos a 30 °C y se centrifugaron de nuevo. A continuación, se resuspendieron con la mezcla de transformación, se les dió un paso por vórtex de 1 minuto y se dejaron incubar durante 20 min a 42 °C. Las células fueron recogidas de nuevo por centrifugación, resuspendidas finalmente en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MQ, plaqueadas en medio SD de selección e incubadas durante 3 días a 30 °C.

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

240  $\mu$ l PEG 50 % (PEG 3350)  
36  $\mu$ l 1 M LiAc  
5  $\mu$ l ADN esperma de salmón (10 mg/ml)  
3  $\mu$ l ADN plasmídico (~500 ng)  
76  $\mu$ l H<sub>2</sub>O MQ  
  
360  $\mu$ l volumen total



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

Un matraz con medio SD (50 ml) sin leucina fue inoculado con varias colonias de levaduras PJ69-4 $\alpha$  portadoras de la construcción “bait” de interés y se dejó crecer a 30 °C durante 16-18 horas en agitación (300 rpm) hasta alcanzar su fase estacionaria ( $DO_{600} > 1.5$ ). A su vez, 30 ml del cultivo anterior se transfirieron a un matraz de 1 L con 300 ml de medio SD sin leucina y se incubaron a 30 °C durante 1.5-3 horas en agitación (300 rpm) hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.4-0.6. A continuación, las células fueron recogidas por centrifugación a 1000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 ml de tampón TE [1X] estéril. Posteriormente, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, se resuspendieron con la mezcla de transformación mediante agitación en vortex durante 1 minuto y se dejaron incubar a 30 °C durante 10 minutos a 200 rpm. A continuación, se añadieron 1.4 ml de DMSO a las células, se mezclaron bien por inversión y se aplicó un choque térmico a 42 °C en un baño termostatzado durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se enfriaron en hielo durante 1-2 minutos y se recogieron por centrifugación a 2300 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las células obtenidas se resuspendieron en 12 ml de tampón TE [1X]. Finalmente, las células fueron plaqueadas en medio SD de selección y se dejaron incubar durante 3 días a 30 °C.

#### Apéndice 13: Mezcla de transformación para levaduras. Protocolo a gran escala

1.5 ml TE [1X]/100 mM LiAc  
50  $\mu$ l librería ADN copia (200-300 ng/ $\mu$ l)  
200  $\mu$ l ADN de esperma de salmón  
12 ml PEG-3350 (50 %)  
1.5 ml TE [10X]  
1.5 ml LiAc 1M

#### Tampón TE [1X] pH 7.4

Tris 100 mM  
EDTA 10 mM

### II.5.3. Selección por aminoácidos

La selección de los transformantes positivos se realizó en medio selectivo SDglu sólido suplementado con todos los aminoácidos excepto con el que confería resistencia a los transformantes según el vector que se les hubiera introducido. Así, para la selección de transformantes haploides en el experimento de doble híbrido, el vector plasmídico pDEST<sup>TM</sup>22 confería viabilidad a los transformantes en ausencia de triptófano mientras que el vector

plasmídico pDEST<sup>TM</sup>32 confería viabilidad a los transformantes en ausencia de leucina. Por tanto, los transformantes diploides que portaban ambos vectores fueron seleccionados en medio SDglu en ausencia de leucina y triptófano.

## II.6. Estudios de expresión génica

### II.6.1. Tratamiento del ARN con *DNasaI*

Previamente a su retrotranscripción, todas las muestras de ARN usadas se trataron con *DNasaI* libre de *RNasas* (Invitrogen<sup>TM</sup>) para eliminar cualquier residuo de ADN genómico arrastrado durante su extracción y así evitar amplificaciones inespecíficas en posteriores reacciones de amplificación. El tratamiento con *DNasaI* se aplicó a muestras de 40-50 µg de ARN total.

<b>Apéndice 14: Tratamiento de ARN con <i>DNasaI</i></b>	
Muestra de ARN total (40-50 µg)	x 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 <sup>TM</sup> ) [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 0,1 volúmenes de acetato sódico [3M] pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100 % a -80 °C durante 1 hora. El ARN precipitado se recuperó por centrifugación y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O estéril tratada con DEPC. Todas las soluciones empleadas se trataron con DEPC y se esterilizaron antes de su uso. La concentración y el grado de pureza del ARN tratado y precipitado se determinaron con un espectrofotómetro *NanoDrop* (*ND-100 Spectrophotometer*). La integridad de las muestras se determinó mediante su visualización en gel de agarosa al 1 % (p/v).

### II.6.2. Comprobación de la pureza del ARN total

Antes de proceder a la retrotranscripción del ARN tratado con *DNasaI*, siempre se estimó el grado de pureza de las muestras correspondientes mediante la determinación de su grado de contaminación por polisacáridos y proteínas. Para ello se determinó la relación  $Abs_{260nm}/$

AbS<sub>230nm</sub> (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1.*) Finalmente, y una vez comprobada la calidad de la muestra, el volumen total se diluyó hasta una concentración de trabajo de 1 µg/ml.

### II.6.3. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

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

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

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

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

dímeros de cebadores, cuando aparecieron, lo hicieron en los ciclos finales de la PCR, donde no interfirieron con el valor de Ct del amplicón que apareció en los primeros ciclos de la reacción.

### II.6.3.1. Reacción de retrotranscripción

La retrotranscripción de las muestras a analizar se realizó empleando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche). La enzima empleada es una transcriptasa reversa que combina alta sensibilidad y alta termoestabilidad, llegando a sintetizar productos de cDNA de gran longitud (hasta 14 kb) empleando sólo el cebador oligo(dT)<sub>18</sub> incluido en el *kit*. Debido a su termoestabilidad, el uso de esta enzima está recomendado para una amplia variedad de moldes (ARN con regiones ricas en GC y estructuras secundarias). La síntesis de la cadena monocatenaria de ADNc se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

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

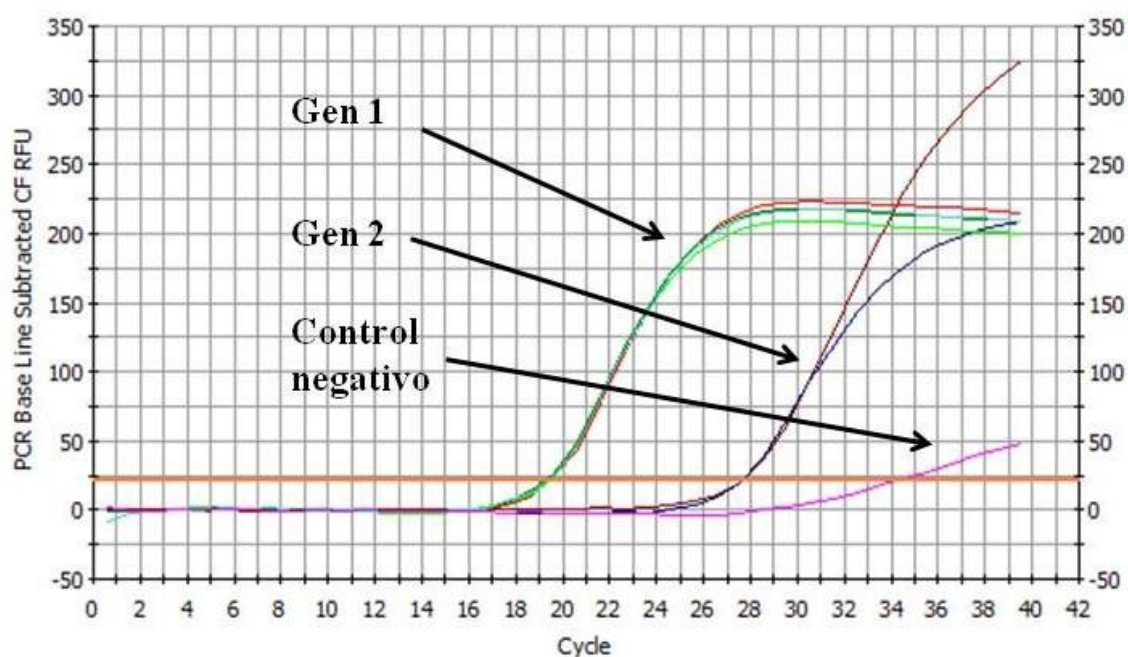
A partir de los ADNc sintetizados previamente, se llevaron a cabo amplificaciones en tiempo real que permitieron comparar los niveles de transcrito correspondientes a los genes en estudio en condiciones experimentales frente a condiciones control. La reacción de amplificación en tiempo real se realizó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

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

La amplificación de las muestras se llevó a cabo empleando los kits *iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* (Bio-Rad) o *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  $\mu$ l 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 (iQ™ 96-Well PCR Plates, Bio-Rad) se cubrió con una lámina transparente de plástico (Microseal® 'B' Adhesive Seals, Optical, Bio-Rad) evitando dejar alguna huella sobre la misma que pudiera interferir en la emisión de fluorescencia. Cuando esta lámina de plástico sufre el primer calentamiento en el termociclador, la placa se sella completamente evitando la pérdida de muestra por evaporación.

En general, en todas las amplificaciones realizadas se empleó el mismo programa básico (Tabla 5) y el resultado de cada amplificación se visualizó directamente para cada ciclo durante el transcurso de la reacción (Figura 12).

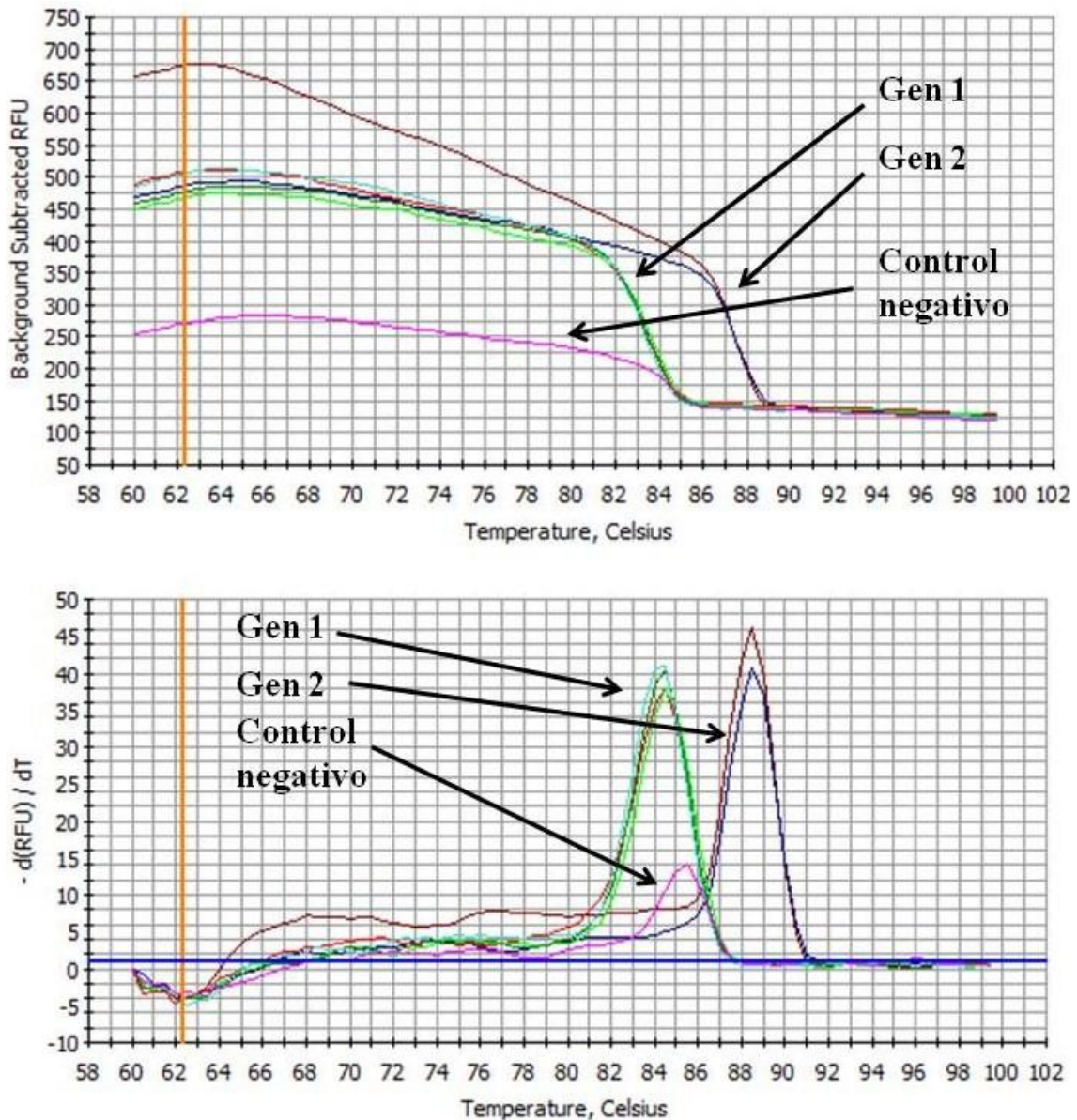


**Figura 12: Ejemplo de curvas de amplificación en un iCycler iQ system (Bio-Rad).** Se muestran las curvas correspondientes a un gen problema (gen 1) y al gen interespaciador *26S-18S* (gen 2). También, se representa la curva de amplificación correspondiente al control negativo (sin ADNc), cuya señal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

### II.6.3.3. Curva de fusión de las muestras amplificadas

Una vez terminada la amplificación de las muestras, éstas se sometieron a un programa de desnaturalización progresiva (“programa de *melting*”) (Tabla 6) que nos proporcionó una curva de fusión independiente (*curva de melting*) para cada una de las muestras amplificadas (Figura 13A). Este programa se basa en el aumento progresivo de 0,5 °C de temperatura por ciclo, desde 204

una temperatura inicial de 60 °C hasta una final de 95 °C. De esta manera, las moléculas de menor tamaño y con menos puentes de hidrógeno intercatenarios se disociarán antes que las de tamaño superior, que poseen un mayor número de puentes, detectándose una curva de fusión diferente para cada una de las especies moleculares existentes en la muestra. Por tanto, las curvas de “melting” se emplearon para determinar el número de amplicones presentes en una misma reacción de PCR y detectar posibles contaminantes (Figura 13B). También, fueron útiles para normalizar la reacción y eliminar el ruido de fondo de los dímeros de cebadores.



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

**Tabla 6: Programa de *melting* empleado para la generación de curvas de fusión.**

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

#### II.6.3.4. Análisis de los datos

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

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

#### II.6.3.5. Normalización y representación de los datos

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

En este trabajo se emplearon varios genes como control: el gen NDR1 y el gen que codifica la región interespaciadora 26S-18S, ambos de expresión constitutiva y constante en todas las condiciones experimentales analizadas. La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de los genes control se recoge en *Materiales y Métodos*, apartado II.3.5.2 (Tabla 4).

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

$$\text{Incremento de la expresión} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

donde  $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen constitutivo}$   
 y  $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ gen inducido} - \Delta Ct \text{ control}$

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

## II.7. Obtención y análisis de la proteína recombinante FaNCED1

### II.7.1. Aislamiento mediante RACE del ADNc completo correspondiente al gen *FaNCED1* y *FaPRE1*

Se empleó el kit *Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit* (BD Biociences), siguiendo siempre el manual suministrado por la casa comercial ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)). Así, a partir de una mezcla de *dsADNc Marathon* previamente obtenida, se realizó una amplificación selectiva empleando el cebador AP1 (contenido en el ADNc) combinado independientemente con los oligonucleótidos específicos FaNCED1-up y FaNCED1-low, ambos diseñados a partir de la EST de secuencia parcial correspondiente al gen *FaNCED1*. De esta forma, se aislaron e identificaron dos fragmentos del ADNc del gen *FaNCED1*, uno hacia el extremo 3' y otro hacia el 5', que cuando se solaparon bioinformáticamente, dieron lugar a la secuencia teórica correspondiente al ADNc completo de dicho gen. La enzima empleada para la amplificación fue la *Taq Advantage* de alta fidelidad recomendada por la casa comercial. La mezcla de reacción y el programa de PCR utilizados se describen en el Apéndice 15.

<b>Apéndice 15: RACE</b>	
Mezcla de reacción de PCR	Programa utilizado
Advantage buffer 2xPCR 5 $\mu$ l dNTPs (10 mM) 2 $\mu$ l Cebador AP1 (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ l Cebador FaNCED1 up* o low* (10 $\mu$ M) 8 $\mu$ l Advantage Polimerasa 1 $\mu$ l Marathon ADNc 5 $\mu$ l H <sub>2</sub> O 35 $\mu$ l	94 °C, 30 seg 94 °C, 5 seg 60 °C, 20 seg 68 °C, 3 min 78 °C, 10 min 4 °C, mantenido <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin-top: 10px;"> <span style="font-size: 2em;">}</span> 30 ciclos         </div>
*Ver secuencia en la Tabla 4 (apartado II.3.5.2)	



El producto de la reacción de amplificación se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y los fragmentos resultantes se purificaron a partir del gel utilizando el kit comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La cantidad de ADNc obtenida se cuantificó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop*. Los distintos fragmentos de *dsADNc-FaNCED1* amplificados se clonaron directamente en el vector comercial pGEM®-T Easy mediante una reacción de ligación (*Materiales y Métodos, apartado II.3.4*).

La mezcla de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C y, posteriormente, a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Del volumen total de la mezcla de ligación se emplearon 10 µl para transformar una alícuota de células competentes de *E.coli* DH5a. A continuación, las células transformadas se sembraron en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (20 mM) y X-Gal (80 µg/ml) y se dejaron crecer durante 12 horas a 37 °C. De los transformantes positivos obtenidos, se seleccionaron 25 colonias (blancas) que se comprobaron mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos del gen *FaNCED1*. Paralelamente, para determinar la secuencia y orientación del inserto dentro del vector de clonación, se secuenciaron varios de los clones recombinantes positivos previamente analizados por PCR. Para ello, se utilizaron los cebadores universales T7 y SP6. Mediante el ensamblaje de las secuencias de los diferentes fragmentos secuenciados, se obtuvo el ADNc teórico completo del gen *FaNCED1*. Éste sirvió como molde para diseñar cebadores específicos del extremo 5' (FLNCED1-up) y 3' (FLNCED1-low) (Tabla 4, *Materiales y métodos, apartado II.3.5.2*), que se emplearon para aislar físicamente el ADNc completo real correspondiente al gen *FaNCED1* a partir de una población de ADNc de estadio rojo. Para todo el proceso de amplificación, se empleó la enzima de alta fidelidad *iProof DNA polimerasa*. La mezcla de reacción y el programa de PCR utilizados se describen en el *Apéndice 16*.

<b>Apéndice 16: Obtención del ADN copia completo (“full-length”)</b>	
<b>Mezcla de reacción de PCR</b>	<b>Programa utilizado</b>
5X iProof HF Buffer 10 µl dNTPs (5 mM) 2 µl FLNCED1-up* (2 µM) 12,5 µl FLNCED1-low* (2 µM) 12,5 µl <i>iProof DNA polimerasa</i> 0,5 µl ADNc 2 µl H <sub>2</sub> O 10,5 µl	98 °C, 1 min 98 °C, 10 seg 55 °C, 30 seg 72 °C, 50 seg 72 °C, 5 min 4 °C, mantenido <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <span style="font-size: 2em; margin-right: 5px;">}</span> <span>35 ciclos</span> </div>
*Ver secuencia en la Tabla 4 ( <i>apartado II.3.5.2</i> )	

El producto de la reacción de amplificación se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (p/v) y el fragmento de ds-ADNc se extrajo y se purificó del gel utilizando el *kit* comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen). Tras su poliadenilación (*Apéndice 17*), el ADNc completo correspondiente al gen *FaNCED1* se volvió a purificar como se indica previamente y, a continuación, se subclonó en el vector de clonación pGEM®-T Easy (*Materiales y Métodos, apartado II.3.4*). Nuevamente, se transformó una alícuota de células *E.coli* DH5α con la construcción obtenida, se seleccionaron transformantes positivos en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (20 mM) y X-Gal (80 µg/ml), y varios de ellos fueron comprobados mediante PCR y secuenciación.

<b>Apéndice 17: 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 <i>DNA polimerasa</i> 1 µl ADN 27 µl H <sub>2</sub> O 14,5 µl	72 °C, 20 min

Para aislar el ADNc completo del gen *FaPRE1* se procedió de forma idéntica a lo descrito anteriormente aunque los oligos específicos empleados fueron el PRE1-up y PRE1-low (Tabla 4; *Materiales y métodos, apartado II.3.5.2*), diseñados sobre la secuencia de la EST correspondiente al gen *FaPRE1* de la que disponíamos. A continuación, una vez obtenidos por RACE los fragmentos correspondientes y ensamblados informáticamente, se diseñó una nueva pareja de cebadores para aislar el ADNc completo correspondiente al gen *FaPRE1* (FLPRE1-up y FLPRE1-low; Tabla 4; *Materiales y métodos, apartado II.3.5.2*).

### **II.7.2. Clonación del ADNc correspondiente al gen *FaNCED1* en el vector pGEX-4T-1 (Amersham)**

El ADNc completo correspondiente al gen *FaNCED1* se subclonó en fase de lectura dentro del vector de expresión pGEX-4T-1 para obtener la proteína recombinante GST-FaNCED1. Para ello, y para asegurarnos la amplificación de la región codificante completa del gen *FaNCED1*, se diseñaron dos cebadores específicos: uno en el extremo 5', en el cual se eliminó el codón ATG de la proteína y se incluyó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *EcoRI* (NCED1-prot-fw); y otro en el extremo 3' en el cual se eliminó el codón TGA de la proteína y se incluyó un sitio de reconocimiento para *XhoI* (NCED1-prot-rv). La amplificación del ADNc completo con ambos cebadores facilitó posteriormente su subclonaje en fase de lectura

dentro del vector de expresión. Para dicha amplificación, se empleó *iProof DNA polimerasa* de alta fidelidad. La mezcla de reacción y el programa de PCR empleados se detallan en el Apéndice 18.

<b>Apéndice 18: Obtención del ADN copia completo (“full-length”) flanqueado por sitios de restricción</b>	
<b>Mezcla de reacción de PCR</b>	<b>Programa utilizado</b>
5X iProof HF Buffer 10 µl dNTPs (5 mM) 2 µl NCED1-prot-fw* (2 µM) 12,5 µl NCED1-prot-rv* (2 µM) 12,5 µl <i>iProof DNA polimerasa</i> 0,5 µl ADNc 2 µl H <sub>2</sub> O 10,5 µl	98 °C, 1 min 98 °C, 10 seg 55 °C, 30 seg 72 °C, 50 seg 72 °C, 5 min 4 °C, mantenido <div style="display: flex; align-items: center; margin-left: 20px;"> <span style="font-size: 2em;">}</span> <span style="margin-left: 5px;">35 ciclos</span> </div>
*Ver secuencia en la Tabla 4 (apartado II.3.5.2)	

El producto de la reacción de amplificación se visualizó electroforéticamente. El fragmento de ds-ADNc correspondiente al gen *FaNCED1* se extrajo y se purificó del gel utilizando el kit comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, el fragmento de ADN purificado se poliadeniló (Apéndice 17), se volvió a purificar con *QIAGEN® Plasmid Mini Kit* (Qiagen), y finalmente se subclonó en el vector pGEM®-T Easy (*Materiales y Métodos, apartado II.3.4*).

Seguidamente, se procedió al subclonaje de la región codificante completa correspondiente al gen *FaNCED1* en el vector de expresión pGEX-4T-1. Para ello, tanto el *dsADNc-FaNCED1* (previamente clonado en pGEM®-T Easy), como el vector pGEX-4T-1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* generando extremos cohesivos complementarios. La recircularización del vector digerido se evitó mediante su desfosforilación con *CIAP* (*Materiales y Métodos, apartado II.3.4*), lo que favoreció el rendimiento de la reacción de ligación. Una vez que vector e inserto estuvieron digeridos y purificados con el kit comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen), ambos se sometieron a una reacción de ligación con una relación vector:inserto de 1:5 (*Materiales y Métodos, apartado II.3.4*). La reacción se incubó a 4 °C toda la noche y, transcurrido este tiempo, a temperatura ambiente aproximadamente 2 horas. A continuación, se transformó una parte alícuota de células competentes *E.coli* DH5a con el total de la reacción de ligación y éstas, una vez transformadas, se sembraron en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron crecer al menos 12 horas a 37 °C. Del total de colonias positivas obtenidas, se seleccionaron 10 para comprobar si la construcción pGEX-4T-1-*FaNCED1* era correcta. Se purificó ADN plasmídico de todas las colonias positivas seleccionadas y, mediante digestión con *EcoRI* y *XhoI*, se liberó

el inserto de *ADNc-FaNCED1* para comprobar el tamaño del mismo mediante electroforesis. Así mismo, para confirmar que el fragmento de *ADNc-FaNCED1* estaba en la fase de lectura correcta (“*frame*”) dentro del vector de expresión pGEX-4T-1, se procedió a la secuenciación del ADN plasmídico procedente de varios clones recombinantes independientes empleando los cebadores específicos pGEX5’ y pGEX3’. Las secuencias obtenidas confirmaron que el ADNc del gen *FaNCED1* se encontraba en el marco de lectura adecuado dentro del vector de expresión pGEX-4T-1 e inmediatamente después del gen que codifica la proteína GST. De todos los clones positivos analizados y secuenciados, se seleccionó uno para su uso en experimentos posteriores de inducción de la proteína de fusión recombinante. Previamente, hubo que transformar células competentes *E.coli* BL21 con la construcción correspondiente (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*). En esta ocasión, los transformantes positivos se seleccionaron en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (100 µg/ml).

### **II.7.3. Inducción de la proteína recombinante de fusión GST-FaNCED1**

Los ensayos de inducción, purificación y determinación de la actividad enzimática fueron llevados a cabo durante una estancia en la Universidad Técnica de Munich (TUM) bajo la supervisión del Dr. W. Schwab.

Para la inducción de la proteína de fusión GST-FaNCED1, varios cultivos de células de *E.coli* BL21 conteniendo la construcción pGEX-4T-1-*FaNCED1* se crecieron a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol (ambos a 100 µg/ml) durante 12 horas. Al día siguiente, empleando como inóculo 3 ml de los cultivos anteriores, se crecieron nuevos cultivos en presencia de ampicilina y cloranfenicol en matraces de 300 ml para permitir una correcta aireación del medio. Éstos se mantuvieron a 37 °C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0.6$ , momento en el que se procedió a la inducción de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo inducido se dejó crecer a 16 °C y 150 rpm durante unas 12 horas, parámetros óptimos para la obtención de una concentración apropiada de proteína recombinante.

### **II.7.4. Purificación de la proteína recombinante FaNCED1**

Finalizada la inducción de la proteína recombinante, las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se congeló a -80 °C durante 15 minutos y, transcurrida la incubación, se resuspendió en 8 ml de tampón de lavado [1X]. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo Falcon y, siempre en hielo, se sonicó 30 segundos con un 10 % de energía al menos 3 veces. A continuación, la muestra se centrifugó

nuevamente a 18000 rpm durante 20-30 minutos a 4 °C para recuperar en el sobrenadante la proteína soluble total liberada tras la sonicación que incluye también la proteína recombinante.

Para la purificación de la proteína recombinante FaNCED1 se empleó *GST-Sepharose* (Novogen). Previamente, una alícuota de *GST-Sepharose* (500 µl) se dispuso en un tubo Falcon de 15 ml y se sometió a varios lavados con 4 ml de tampón de lavado [1X] frío. A continuación, la resina *GST-Sepharose* tratada se incubó en agitación con la proteína recombinante en suspensión a 4 °C durante, al menos, 30 minutos para favorecer la interacción de la GST fusionada a la proteína recombinante FaNCED1 con la resina. Transcurrido el periodo de incubación, la mezcla se centrifugó en frío a 800 g durante 3 minutos y el pellet obtenido se lavó varias veces con 8 ml de tampón de lavado. Posteriormente, la muestra se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en 200 µl de tampón de elución y, tras centrifugarla a 800 g durante 5 minutos, recogimos el sobrenadante (Fracción 1 de la proteína total). La muestra se volvió a incubar durante 5 minutos en 200 µl de tampón de elución en las mismas condiciones anteriores y, nuevamente, recogimos el sobrenadante (Fracción 2 de la proteína total).

<b>Apéndice 19: Soluciones empleadas para la inducción y purificación de la proteína recombinante</b>	
<b>Medio LB (Apéndice 1)</b>	<b>Tampón de reconstitución [10X] pH 8</b> Tris-HCl 500 mM
<b>Tampón de lavado [10X] pH 7,3</b> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O 43 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,7 mM NaCl 1,37 M KCl 27 mM	<b>Tampón de elución [1X]</b> Tampón de reconstitución [1X] + Glutación 10 mM

## II.7.5. Análisis de la proteína recombinante FaNCED1

### II.7.5.1. Cuantificación de la proteína recombinante

La concentración de proteína recombinante obtenida en la inducción se determinó por el método de *Bradford* (Bradford, 1976). Para ello, se hicieron por duplicado medidas de cada muestra añadiendo un volumen variable de muestra (100 µl como máximo) y 900 µl de reactivo *Bradford* (“Protein Assay”, BioRad) diluido cinco veces con H<sub>2</sub>O destilada. La medida espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 595 nm y el valor de la proteína total final se expresó en µg de proteína/ml de extracto. El cálculo de la concentración de proteína problema final se realizó a partir de una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de BSA.

### II.7.5.2. Separación electroforética de la proteína recombinante en SDS-PAGE

La identificación y el aislamiento de la proteína recombinante GST-FaNCED1 se llevó a cabo en geles de acrilamida. Previamente a la electroforesis, las muestras fueron tratadas con *ROTI LOAD* (Roth), tampón de carga especial que estabiliza y protege los enlaces péptidos de las proteínas evitando su degradación. Así, a cada 10  $\mu$ l de muestra se añadieron 3,3  $\mu$ l de *ROTI LOAD* y la mezcla se incubó 3 minutos a 95 °C. Paralelamente, se polimerizó el gel *Tris-Glycin-SDS (Progel Tris-Glycin 12 % 1.0 mm, ANAMED)* y se introdujo en un tanque con tampón Tris/Glicina [1X]. La electroforesis se realizó a 30 mA, 40 W y 150 V durante 1 hora. Finalizado este tiempo, el gel se tiñó durante 30 minutos en una solución de azul de *Coomassie G250* al 0,25 % (p/v) (*Apéndice 20*). El exceso de colorante se eliminó posteriormente con solución de lavado en agitación suave durante el tiempo necesario para visualizar las bandas correspondientes a las proteínas.

<b>Apéndice 20</b>	
<b>Soluciones empleadas para la electroforesis de geles de poliacrilamida</b>	
<b>Tampón Tris/Glicina [10X]</b> (no es necesario ajustar el pH) Tris-Base 0.25 M Glicina 1.92 M Hasta 1l con H <sub>2</sub> O MQ	
<b>Soluciones empleadas para la coloración/decoloración de geles de poliacrilamida</b>	
<b>Solución de tinción</b> 0,33 g Azul de Coomassie G250 en 120 ml Metanol 24 ml Ácido acético 120 ml H <sub>2</sub> O	<b>Solución de lavado</b> 7 % Ácido acético 10 % Metanol

### II.7.6. Determinación de la actividad enzimática FaNCED1

#### II.7.6.1. Ensayo de la actividad enzimática *in vitro*

Tras el proceso de inducción y purificación, la actividad de la proteína recombinante FaNCED1 fue ensayada para determinar su actividad sobre los sustratos neoxantina, 9-*cis*-zeaxantina y 9-*cis*-violaxantina a 0.1 mg/ml. Se mezclaron 125  $\mu$ l de cada uno de los sustratos con 62.5  $\mu$ l de  $\beta$ -octil glucósido (4 %, p/v) y se dejaron secar bajo corriente de nitrógeno. A continuación, fueron añadidos 250  $\mu$ l de proteína, tanto en forma de extracto crudo como purificada, y las soluciones fueron mezcladas vigorosamente mediante vórtex. Posteriormente, el ensayo se llevó a cabo incubando la mezcla de reacción durante 12-16 horas a 30 °C en agitación y oscuridad.

**Apéndice 21: Mezcla de reacción para el ensayo enzimático de FaNCED1**

Tritón X-100 0,1 %  
Bis-Tris 100 mM  
FeSO<sub>4</sub> 500 µM  
Na-Ascorbato 5 mM  
Proteína recombinante

Las reacciones incubadas fueron extraídas dos veces con volúmenes equivalentes de etil acetato. La fase orgánica fue secada bajo corriente de nitrógeno y reconstituida en etanol 100 % para ser posteriormente analizada por cromatografía de capa fina (TLC) o en metanol 100 % para los análisis por LC-MS.

**II.7.6.2. Cromatografía de capa fina**

Los productos de la reacción enzimática, reconstituidos previamente en etanol, fueron visualizados en una placa de gel de sílice UV<sub>254</sub>. La placa se desarrolló en una mezcla de solventes formada por *n*-hexano:isopropanol (90:10, v/v) en una cámara de gases cerrada durante 1-2 horas. El experimento se hizo por triplicado. Después de la separación de los productos, las placas de TLC se dejaron secar. Posteriormente, se rociaron mediante spray con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4D) y se secaron en una estufa a 60 °C durante 5 minutos o hasta que aparecieron los puntos coloreados correspondientes a los productos. Finalmente, los gels fueron escaneados para la adquisición de la imagen de los mismos.

**II.7.6.3. Extracción de productos desde gel de sílice**

Para purificar e identificar los productos revelados en el gel de sílice, las bandas de color visualizadas en las placas de sílice tras la cromatografía de capa fina fueron desprendidas con la ayuda de un bisturí y recogidas en un tubo eppendorf. Los productos se extrajeron del gel de sílice 2 veces con 2 volúmenes de metanol, mediante agitación vigorosa y a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a máxima velocidad y el sobrenadante fue recogido en un tubo nuevo y se volvió a centrifugar para asegurar la retirada completa de todas las partículas de gel de sílice. El sobrenadante se recogió en un tubo nuevo y la muestra se concentró bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen apropiado para los análisis posteriores de LC-MS.

#### II.7.6.4. Análisis de productos por HPLC-MS

Debido a la falta de disponibilidad comercial de los productos teóricos C15-xantosina y C25-epoxy-apocarotenal para ser empleados como patrones internos, se empleó ABA como estándar relativo debido a su similitud con la xantosina.

Los sobrenadantes recuperados tras la cromatografía de capa fina fueron procesados para su medida por HPLC-MS (Agilent1100). El volumen de inyección fue 5  $\mu\text{l}$  y la columna empleada fue C18 Phenomenex, con una i.d. 150x2.0 mm y un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ . La fase móvil empleada estuvo compuesta de agua/metanol (80:20, v/v) (0,1 % ácido fórmico), con un flujo de 0.2  $\text{mL min}^{-1}$ . La MS constó de un sistema SMART-Mode y el flujo de  $\text{N}_2$  empleado fue de 10 L/min. El voltaje de ionización por electrospray del capilar se fijó a -4000 V. Los espectros de masas de barrido completo se midieron en un rango de exploración de m/z de 50 a 800, con una resolución de escaneo de 13.000 m/z/s hasta que el objetivo de la ICC llegó a 20.000 ms o 200 ms, lo que se lograra primero. El tándem de espectrometría de masas se llevó a cabo usando helio como gas de colisión ( $3.56310^{-6}$  mbar) con la tensión de la colisión fijada en 1 V. Los espectros se adquirieron en el modo de ionización positivo y negativo. La xantosina y el ABA fueron detectados a una longitud de onda de 300 nm y el C25-epoxy-apocarotenal a 400 nm. Para procesar los datos cuantitativos obtenidos a partir de los estándares de calibración y las muestras de las plantas se empleó el software 5.1 DataAnalysis (Bruker Daltonics).

#### II.8. Generación y análisis de *microarray*

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

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



procedimiento descrito en la sección de análisis de expresión disponible en <http://www.nimblegen.com/>.

En general, se procesaron 10 µg de ARN total procedente de receptáculo de fruto de fresa (*Roche cDNA Synthesis System*). Este sistema está optimizado para la síntesis de ADNc de doble cadena que, una vez obtenido, fue purificado con el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche) según el protocolo aportado por la casa comercial. Las muestras purificadas se sometieron a transcripción reversa, llevando a cabo tres reacciones de transcripción reversa por cada muestra de partida de ARN total. Cada muestra de ADNc obtenida fue marcada por cebadores al azar con nonúmeros de Cy3 usando el kit de marcaje *NimbleGen One-Color DNA Labeling* 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.

### **II.8.1 Anotación de secuencias a partir de una librería de ESTs**

Se empleó el programa Blast2GO v2.7.2 para la anotación funcional de las secuencias EST utilizando BLASTX con un valor de corte esperado de 1.0E-10 y su propia base de datos pública a fecha de septiembre de 2013 (Conesa *et al.*, 2005). Se tuvieron en cuenta para este análisis sólo los genes del microarray que presentaban valores de expresión superiores o inferiores a  $\pm 2$  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.

## **II.9. Extracción de compuestos volátiles, pigmentos y hormonas del fruto de fresa**

### **II.9.1. Extracción de compuestos volátiles**

#### *Extracción de eugenol. Método de Luke*

Se tomaron 5 g de tejido (peso fresco) pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en 50 ml de acetona:éter de petróleo:diclorometano (1:1:1) y 5 g de  $MgSO_4$  para desecar la muestra. La mezcla fue homogeneizada con la ayuda de un ultraturrax y centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un matraz de evaporación esmerilado apropiado para la desecación de la muestra en un rotavapor o evaporador rotatorio a presión reducida. Finalmente, el extracto fue reconstituido en un 1 ml de ciclohexano:acetona (9:1) y analizado por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS).

#### **II.9.1.1. Análisis de productos por GC-MS**

Los análisis realizados por GC/MS fueron llevados a cabo con un detector Triple Cuadrupolo (CG/MS Bruker Mod. SCION). La columna de GC utilizada es de 30 m y 0,25 mm d.i. con fase 5 % fenilsilicona (0,25  $\mu m$ ). Se inyectó 1  $\mu l$  de muestra en modo splitless a 250 °C, trabajando con un programa de temperatura de horno de 60 °C (2 min.), 5 °/min hasta 300 °C (5 min.). La detección por MS se realizó en modo de ionización de Impacto Electrónico (70 eV) y detección de iones SIM (Selecting Ion Monitoring) monitorizando tres iones por analito. La cualificación del mismo se realizó en base a los tiempos de retención (desviación <0.5 %) y los ion ratio de los dos iones de cualificación (desviación <15 %) tal y como marcan diferentes normas de referencia. La cuantificación se llevó a cabo en base a rectas de calibrado obtenidas previamente en modo externo y en un rango de trabajo comprendido entre 5 y 250 ng/ml.

### **II.9.2. Extracción de antocianinas y clorofila**

#### *Extracción de antocianinas totales*

Se tomó un 1 g de tejido (peso fresco) pulverizado en presencia de nitrógeno líquido en 10 ml de 1 mol/l de HCl-metanólico (12N HCl:99,9 % MeOH = 1:35) durante 72 h a 4 °C en agitación constante. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad y el sobrenadante fue recuperado. El contenido total de antocianinas de cada muestra fue calculado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm (Rabino y Mancinelli, 1986) y aplicando la fórmula  $A_{530} - 0,25 A_{657}$  para eliminar la influencia de la clorofila contenida en los

extractos analizados (Mancinelli y Schwartz, 1984). Se realizaron, al menos, 3 extracciones independientes de cada muestra. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa informático GraphPad InStat (*Materiales y Métodos, apartado II.15*).

#### *Extracción de clorofila*

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

### **II.9.3. Extracción de ABA**

Para la extracción de ácido abscísico a partir de frutos de fresa, se empleó como estándar interno ácido abscísico deuterado (dABA). Durante su preparación, los protones del anillo del ABA (5 mg) se intercambiaron durante al menos 48 horas en 10 ml de agua pesada (Sigma: pureza isotópica 99,96 %) a temperatura ambiente y en presencia de hidróxido de sodio 1M deuterado (Sigma: pureza isotópica 99 %) (Rock y Zeevaart, 1990). El medio se acidificó a pH 3 con ácido clorhídrico. La solución ácida se mezcló con éter dietílico (50:50,v/v), se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se desecó a 35 °C. Las muestras que contenían [H] se disolvieron en metanol. La pureza del [<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 (*Materiales y Métodos, Apartado I.2.1*) 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 DataAnalysis (Bruker Daltonics).

## II.10. Generación de plantas transgénicas

### II.10.1. 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 λ (Landy, 1989). Este sistema utiliza una mezcla de enzimas de recombinación constituida por la *Integrasa* (*Int*), una *Excisionasa* (*Xis*) y la proteína IHF (*Integration Host Factor*) codificada por *E. coli* para catalizar la reacción de recombinación *LR clonasa Gateway*<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* (pK7WG2.0) que incluye las regiones *attR*. Mediante esta recombinación específica entre los sitios *att* (*attR* x *attL* ↔ *attB* x *attP*) se genera un vector de expresión destinado a la obtención de plantas transgénicas (Figura 6).

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 *ccd* que permite una selección negativa del *Destination vector* en *E. coli* siempre que la recombinación haya transcurrido adecuadamente. La proteína *CcdB* interfiere con la ADN girasa de *E. coli* inhibiendo así el crecimiento de la mayoría de sus cepas (por ejemplo, DH5α<sup>™</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 (pK7WG2-*gen*) se realiza en células de *E. coli* carentes del episoma F' y en presencia

de kanamicina, seleccionando así solamente aquellas células que incorporan un vector carente del gen *ccdB* y con resistencia a kanamicina.

#### II.10.1.1. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>)

El vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) se empleó como *Entry vector* para el subclonaje de productos de PCR procedentes de la amplificación de una región previamente seleccionada correspondiente a la secuencia codificante completa del gen *FaPRE1*. Posteriormente y de manera independiente, el fragmento amplificado fue transferido desde el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> mediante recombinación de las regiones *att* al vector binario pK7WG2.0 mediante la metodología *Gateway*<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) (*Materiales y Métodos, apartado II.10*). Obtuvimos así el vector de expresión que se empleó para la sobre-expresión del gen *FaPRE1* en plantas de fresa.

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. La mezcla de reacción empleada, así como el programa de PCR utilizado se recogen en *Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2*. Rutinariamente, tras una purificación previa del fragmento de PCR generado, al programa general de PCR se le adicionó un paso de poliadenilación a 72 °C de 30 minutos de duración (*Materiales y Métodos, apéndice 17*) 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>. En cualquier caso, la amplificación de los fragmentos de ADN correspondiente a *FaPRE1* se realizó empleando oligonucleótidos diseñados específicamente para este gen (*Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2, Tabla 4*).

Tras la poliadenilación, se procedió de nuevo a la purificación del producto de PCR obtenido con el kit *FavorPrep<sup>™</sup> GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez determinada la concentración del ADN recuperado mediante espectrofotometría (*Materiales y Métodos, apartado II.2.1.*), se procedió a su subclonaje dentro del vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> utilizando la mezcla de reacción que se detalla en el *Apéndice 22* 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>™</sup>) empleando 2-6 µl de la mezcla de reacción (*Materiales y Métodos, apartado II.4.2*).

**Apéndice 22: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>)**

Amplicón purificado	2 µl
Solución salina (Invitrogen <sup>™</sup> )	1 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	2 µl
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen <sup>™</sup> )	1 µl

**II.10.1.2. Subclonaje de moléculas de ADN en el vector pK7WG2.0 mediante la reacción LR clonasa Gateway (Invitrogen<sup>™</sup>)**

Una vez generados los *Entry vector* pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> conteniendo el fragmento de ADN correspondiente a *FaPRE1*, se procedió a su transferencia por recombinación al vector binario pK7WG2.0 en una reacción mediada por la *LR clonasa Gateway* (Invitrogen<sup>™</sup>).

La recombinación se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción y adicionando los reactivos en el orden indicado:

pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> :: <i>inserto</i> (300 ng)	1-10 µl
pK7WG2.0 (300 ng)	2 µl
Tampón de reacción de la LR Clonasa [5X]	4 µl
Tampón TE pH 8	hasta 16 µl
<i>LR Clonase enzyme mix</i>	4 µl

La mezcla se incubó a 25 °C durante 16 horas y, transcurrido este periodo, se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos en presencia de 2 µl de *Proteinasa K*. A continuación, se procedió a la transformación 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 II.4.2.

**II.10.2. Principios básicos de la transformación genética mediada por *Agrobacterium***

Uno de los métodos más extendidos para la transformación genética de plantas es el empleo de *Agrobacterium* como vector biológico portador del ADN que será transferido a la planta. Esta metodología se basa en la condición natural que posee esta bacteria para insertar genes de manera estable en una célula vegetal. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria Gram-negativa del suelo que produce la enfermedad de “agalla de corona” en una amplio rango de especies de plantas dicotiledóneas. Esta enfermedad se produce por la infección de *Agrobacterium* a través de heridas preexistentes. Así, la bacteria responde con quimiotactismo positivo a las moléculas de naturaleza fenólica que la planta libera al sufrir una herida. La utilización de esta bacteria

como vector ha sido posible gracias a la eliminación mediante ingeniería genética de los genes responsables de la formación del tumor, dejando intacto el resto de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de colonización (Hoekema *et al.*, 1983; Potrykus, 1991; Hooyakaas y Beijersbergen, 1994; Christie, 1997; de la Riva *et al.*, 1998; Gelvin, 2003).

En el plásmido binario desarmado contenido en *Agrobacterium*, se sitúa la región denominada T-DNA (*Transfer DNA*), que es la porción de ADN de dicho plásmido que será integrada en el genoma de la planta. En este fragmento de ADN, se localiza un gen de selección (resistencia a antibióticos, herbicidas, etc.), así como el fragmento de interés correspondiente al gen que se desea integrar en la planta. En estas construcciones, los genes están incluidos en casetes que contienen promotores y terminadores reconocibles por la célula vegetal y que son necesarios para la expresión de los genes introducidos. Además, el T-DNA está delimitado por los extremos derecho (RB, *right border*) e izquierdo (LB, *left border*), imprescindibles para la transferencia de éste desde el plásmido binario al genoma de la planta (Caballero *et al.*, 2001).

La metodología de transformación mediada por *Agrobacterium* consiste básicamente en la incubación del explanto vegetal (protoplastos, discos de hoja, callos embriogénicos, etc) con un cultivo de la bacteria que porta el plásmido adecuado. Para aumentar el número de células del explanto competentes para la infección y posterior regeneración, el explanto se somete a daño físico produciéndole heridas que lo predisponen a la infección con *Agrobacterium* y a la incorporación del T-DNA. Este proceso se denomina *inducción*. Tras la *infección*, se realiza un *cocultivo* del explanto con la bacteria en medio no selectivo para permitir la expresión de los genes foráneos en las células vegetales que hayan incorporado el T-DNA. Finalmente, de manera simultánea se realiza la *selección* de las células transformadas y la eliminación de *Agrobacterium* en medio selectivo suplementado con los antibióticos adecuados, (El Mansouri *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 2001).

### **II.10.3. Transformación estable de plantas de *Fragaria × ananassa* “Chandler”**

#### **II.10.3.1. Obtención y mantenimiento de plántulas de *Fragaria × ananassa* “Chandler” *in vitro*.**

Las plántulas de *Fragaria × ananassa* “Chandler” empleadas en este trabajo fueron cedidas por el Dr. F. Pliego Alfaro (Universidad de Málaga) y se obtuvieron mediante la regeneración de ápices caulinares (López-Aranda *et al.*, 1994; El Mansouri *et al.*, 1997). Las plántulas se mantuvieron en medio de multiplicación durante cuatro semanas antes de ser subcultivadas (*Materiales y Métodos, apéndice 23*). En cada subcultivo, siempre se eliminaron las raíces y se

separaron las plántulas aparecidas en yemas axiales que se usaron para multiplicar el *stock* de plántulas. En general, las plántulas se crecieron con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad, con una irradiación de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (lámparas Sylvania Gro-lux), y con una humedad relativa en el interior de la cámara de 60-70 % (El Mansouri *et al.*, 1997).

### **II.10.3.2. Transformación de plantas de *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” mediante infección con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*.**

La transformación de *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” mediada por *A. tumefaciens* se llevó a cabo según el método descrito por Barceló *et al.* (1998), que adaptó a fresa la técnica de transformación previamente descrita por Horsch *et al.* (1985).

El proceso de transformación consta de cuatro fases diferenciadas:

- **Precultivo.** Durante esta etapa se obtuvieron los explantos foliares a usar posteriormente en el proceso de transformación. Para ello, a partir de plántulas *in vitro* de 3-5 semanas de edad, se seleccionaron hojas trifoliadas jóvenes, de mayor potencial regenerativo (Raviv *et al.*, 1987), que se cortaron en secciones de  $5 \text{ mm}^2$ . Los explantos obtenidos se colocaron, siempre con el haz hacia abajo, en placas de Petri con medio de organogénesis (*Materiales y Métodos, apéndice 23*). El precultivo se mantuvo durante 8 días a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y siempre en oscuridad para reducir la exudación fenólica y favorecer la morfogénesis de los explantos (Liu y Standford, 1988; George, 1993; Barceló *et al.*, 1998).
- **Infección.** Durante esta etapa, los explantos foliares obtenidos en la etapa anterior fueron infectados con el cultivo de *Agrobacterium* LBA4404 portador del vector binario que contenía nuestra construcción de interés. Para ello, inicialmente se cultivó la estirpe de *Agrobacterium* portadora de nuestra construcción en 5 ml de medio LB líquido suplementado con rifampicina ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) y espectinomicina ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  y 200 rpm durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se refrescaron varios cultivos empleando como inóculo  $200 \mu\text{l}$  del cultivo anterior. En esta ocasión, los cultivos se crecieron en 5 ml de medio LB líquido (pH 5,4) suplementado con los antibióticos anteriores y con acetosiringona ( $100 \mu\text{M}$ ), un compuesto de naturaleza fenólica que incrementa la virulencia de *Agrobacterium*, y se incubaron a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  y 200 rpm durante 16 h. Una vez alcanzada una  $\text{DO}_{600}$  entre 0.6-1 unidades, los cultivos se diluyeron con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta ajustar su  $\text{DO}_{600}$  a 0.2 en un volumen final de 50 ml y se procedió a la infección propiamente dicha. Así, a cada uno de los cultivos diluidos se les añadió ~40 explantos



de hoja (una vez finalizado el precultivo), que se mantuvieron sumergidos en la solución mediante agitación suave durante 20 minutos. Finalmente, los explantos se recogieron y se secaron sobre dos papeles secantes estériles para eliminar el exceso de medio de cultivo e, inmediatamente después, se dispusieron nuevamente sobre medio de organogénesis manteniendo el haz en contacto con éste.

- **Cocultivo.** Durante esta etapa, los explantos infectados se mantuvieron durante 2 días en ausencia de antibióticos de selección en medio de organogénesis a 25 °C y en oscuridad en una cámara de cultivo.
- **Selección.** Terminado el periodo de cocultivo, durante esta etapa, los explantos se subcultivaron durante 4 días a 25 °C y en oscuridad en nuevo medio de organogénesis suplementado con carbenicilina (500 mg/l), para eliminar a *Agrobacterium*, y kanamicina (25 mg/l), para seleccionar los explantos transformados. Transcurrido este tiempo, los explantos se mantuvieron con un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad a 25 °C en la cámara de cultivo. Durante el periodo de organogénesis y regeneración, que puede variar entre 4 y 6 meses dependiendo de la construcción transformada, los explantos se subcultivaron a nuevo medio de organogénesis selectivo cada 4 semanas. Tras cuatro subcultivos, la concentración de carbenicilina añadida al medio se redujo a 250 mg/l, retirándose completamente en el sexto subcultivo. Simultáneamente, en el cuarto subcultivo, la concentración de kanamicina se incrementó hasta 50-100 mg/l para reducir los eventos de transformación con inestabilidad genética (Houde *et al.*, 2004). Cuando aparecieron plántulas de 2 cm de longitud, éstas se aislaron del resto del explanto y se subcultivaron en medio de multiplicación suplementado con kinetina (0,47 mg/l) y con el antibiótico correspondiente, generalmente kanamicina (100 mg/l). Cada planta obtenida a partir de un explanto se consideró un evento independiente de transformación.

### **II.10.3.3. Aclimatación y multiplicación de las plantas transgénicas**

Se aclimató una única plántula crecida en medio de multiplicación suplementado con kanamicina (100 mg/l) por cada evento independiente de transformación. Siempre se sembraron en macetas de 250 ml con turba y arena (1:1). Las plantas seleccionadas, que siempre tuvieron un sistema radicular bien desarrollado, se extrajeron del medio de cultivo y sus raíces se lavaron con agua abundante para eliminar restos de medio y evitar contaminaciones. A continuación, las raíces se introdujeron en la turba humedecida y, para mantener una humedad elevada, la maceta se cubrió con una bolsa de plástico transparente. Las macetas se mantuvieron a temperatura

**Apéndice 23: 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

*Otros componentes*

Sacarosa 20 g/l

Myo-Inositol 100 mrg/l

Agar de plantas 7 g/l

**Medio MS de organogénesis**

Añadir al medio MS las hormonas:

Ácido Indol-3-butírico (IBA) 0,5 mg/l

6-bencil aminopurina (BA) 2 mg/l

**Medio MS de multiplicación**

Añadir al medio MS la hormona:

Kinetina 0,47 mg/l

*Otros componentes*

Sacarosa 20 g/l

Myo-Inositol 100 mg/l

Agar de plantas 7 g/l

Las hormonas se prepararon a una concentración de almacenamiento de 0,1 mg/l. Para disolverlas, se añadieron unas gotas de NaOH 1N hasta su disolución y luego se completó el volumen con 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.

ambiente con iluminación natural y siempre humedecidas. La aclimatación de la planta se realizó mediante la realización de una abertura de ~1 cm en la bolsa cada dos días hasta retirarla completamente.

Las plantas transgénicas portadoras de la construcción pK7WG2-*FaPRE1* 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 de la UCO y en el CIFA de Churriana (Málaga). La temperatura, humedad y fotoperiodo del invernadero fueron las ambientales. Cuando fue necesario, las plantas se abonaron y fueron sometidas a distintos tratamientos fitosanitarios.

#### **II.10.3.4. Selección y análisis de plantas transgénicas**

La primera selección de las plantas transgénicas se realizó a nivel fenotípico en base a su resistencia frente a kanamicina. Así, todos los explantos resistentes a kanamicina que mostraron un aspecto sano y proliferación de microcallos, se subcultivaron periódicamente manteniendo la presión de selección hasta la generación de plántulas. Cuando éstas presentaron un tamaño suficiente, se crecieron en medio de multiplicación suplementado con kinetina (0,47 mg/l) y kanamicina (100 mg/l) y, posteriormente, fueron trasvasadas a maceta. Este periodo tuvo una duración aproximada de 6-8 meses. Por otro lado, las plántulas necrosadas, etioladas o deformes fueron desechadas.

Las plantas que presentaron resistencia a kanamicina fueron analizadas posteriormente mediante PCR para comprobar su naturaleza transgénica. Para ello, se empleó el kit *Phire Plant Direct PCR Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. De las plantas transgénicas confirmadas, se extrajo ARN y mediante qRT-PCR se determinó el grado de sobreexpresión del trasgén correspondiente en cada una de ellas (*Materiales y Métodos*, apartado II.6.3). En el caso de la sobreexpresión del gen *FaPRE1*, se seleccionaron aquellas líneas transgénicas que presentaron mayor grado de expresión del gen acompañado de un fenotipo más evidente para su posterior análisis histológico y transcriptómico por microarray.

#### **II.10.4. Transformación transitoria mediante agroinfiltración de frutos *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta”.**

##### **II.10.4.1. Obtención y mantenimiento de plantas de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta”**

El cultivar *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” se empleó para la transformación de frutos de fresa mediante agroinfiltración. Las plantas se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y bajo una irradiancia de 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  proporcionada por lámparas Osram Fuora (München, Germany).

#### II.10.4.2. Transformación transitoria de frutos de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” a través de agroinfiltración con *A. tumefaciens* AGL0

La transformación de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” mediada por *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo *et al.*, 1991) se llevó a cabo según el método descrito previamente por Hoffmann *et al.* (2006), que adecuó la técnica de transformación previamente descrita por Spolaore *et al.* (2001) a esta especie.

La estirpe AGL0 de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones pFRN-*FaNCED1*, pFRN-*FaEOBII*, pFRN-*FaPRE1*, pFRN-*FaMYB10* y pFRN-*MYB1* independientemente, fue cultivada a 28 °C en 50 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600} \sim 0.8$ , las células de *Agrobacterium* fueron recolectadas mediante centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y, posteriormente, resuspendidas en 10 ml de medio agar MacConkey modificado (MMA) (*Materiales y Métodos, apéndice 24*) (Spolaore *et al.*, 2001). A continuación, esta suspensión celular se inyectó en frutos en un estadio intermedio entre verde y blanco, generalmente alcanzado 14 días después de la polinización. La suspensión se inyectó uniformemente en el fruto usando una jeringuilla hipodérmica estéril de 2 ml y procurando pinchar una o dos veces solamente para evitar dañar el fruto en exceso. Tras la inyección, las plantas se dejaron nuevamente en la cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas previamente. Aunque se hizo un seguimiento diario de la evolución de los frutos inyectados para comprobar la existencia o no de cambios fenotípicos evidentes, los frutos no se recolectaron hasta 14 días después de la inyección (estadio rojo). En paralelo y de forma simultánea, también se inyectaron frutos con un cultivo de la cepa AGL0 de *A. tumefaciens* sin transformar (control). En cualquier caso, los frutos inyectados, una vez recolectados, se congelaron a -80 °C hasta su uso. Paralelamente, se hizo lo mismo con la estirpe utilizada como control positivo que contenía la construcción pBI-Intrón (Hoffmann *et al.*, 2006). Como control negativo se utilizaron frutos inyectados con el plasmido vacío pFRN.

#### **Apéndice 24: Medios y soluciones empleadas en la transformación transitoria de *Fragaria* × *ananassa* “Elsanta” con *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL0**

**Medio Luria-Bertani** (*Apéndice 1*)

**Medio MMA** (Spolaore *et al.*, 2001)

*Medio MS* (Murashige y Skoog, 1962) (*Apéndice 23*)

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

### II.10.4.3. Análisis de frutos transgénicos

El grado de silenciamiento de los genes en estudio (*FaNCED1*, *FaEOBII*, *FaPRE1*, *FaMYB10* y *FaMYBI*) se determinó mediante qRT-PCR en los frutos transgénicos obtenidos en las diferentes transformaciones realizadas. En el caso de los frutos transgénicos pFRN-*FaEOBII* también se realizaron extracciones de volátiles que posteriormente fueron analizados mediante GC-MS (*Materiales y Métodos*, apartado II.9.1), y con los frutos transgénicos pFRN-*FaNCED1* se realizaron extracciones de ABA que posteriormente fueron analizadas mediante HPLC-MS (*Materiales y Métodos*, apartado II.9.3). En el caso de los genes *FaNCED1*, *FaEOBII* y *FaPRE1*, de entre todos los frutos agroinfiltrados se seleccionaron aquellos que presentaron un grado de silenciamiento superior al 95 % para un análisis transcriptómico detallado mediante microarray.

### II.10.5. Transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* a través de agroinfiltración con *A. tumefaciens* GV3101.

La localización subcelular de la expresión transitoria de los genes en estudio se llevó a cabo con construcciones derivadas del vector binario pK7WGF2.0 (*Materiales y métodos*, apartado I.2.6.), el cual permite la fusión de la proteína GFP en el extremo amino terminal de la proteína en estudio.

Las secuencias completas de los ADNc de los genes *FaPRE1* y *FaEOBII* de fresa fueron amplificadas por PCR usando cebadores específicos para cada gen (*attB*-*PRE1* y *attB*-*EOBII*), (*Materiales y Métodos*, apartado II.3.5.2., Tabla 4) con los sitios *attB1* y *attB2* acoplados. Tras la amplificación, se procedió a la purificación del producto de PCR obtenido empleando el *kit* comercial *FavorPrep<sup>TM</sup> GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen) y a su cuantificación por espectrofotometría (*Materiales y Métodos*, apartado II.2.1.). Entonces, el amplicón purificado fue clonado mediante una reacción BP clonasa (*Gateway<sup>®</sup> BP Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix* (Invitrogen<sup>TM</sup>) en el entry vector pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen<sup>TM</sup>) (*Materiales y Métodos*, apartado I.2.4.) utilizando la mezcla de reacción detallada en el Apéndice 25 e incubando la misma durante toda la noche a 25 °C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, se procedió a la transformación de una alícuota de células competentes *One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen<sup>TM</sup>) con 2-6 µl de la mezcla de reacción (*Materiales y Métodos*, apartado II.4.2).

**Apéndice 25: Mezcla de reacción para el subclonaje de fragmentos de ADN en el vector pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen<sup>TM</sup>)**

Amplicón purificado (producto <i>attB-PCR</i> ) ~ 75 ng	1-7 µl
pDONR <sup>TM</sup> 221 (Invitrogen <sup>TM</sup> ) (150 ng/µl)	1 µl
Tampón TE pH 8	hasta 8 µl
<i>BP clonase enzyme mix II</i>	2 µl

Una vez generado el *Entry vector* pDONR<sup>TM</sup>221 conteniendo independientemente el fragmento de ADNc correspondiente a los genes *FaPRE1* y *FaEOBII*, se procedió a su transferencia al vector binario pK7WGF2.0 mediante la recombinación mediada por la *LR clonasa Gateway* (Invitrogen<sup>TM</sup>) de ambos vectores. El resultado en ambos casos fue una construcción de fusión 35S::GFP::Gen y 35S::Gen::GFP. La recombinación se realizó empleando la siguiente mezcla de reacción y adicionando los reactivos en el orden indicado:

pDONR <sup>TM</sup> 221-ADNc (300 ng)	1-10 µl
pK7WGF2.0 (300 ng)	2 µl
Tampón de reacción de la LR Clonasa [5X]	4 µl
Tampón TE pH 8	hasta 16 µl
<i>LR Clonase enzyme mix</i>	4 µl

La mezcla se incubó a 25 °C durante 16 horas y, transcurrido este periodo, se incubó nuevamente a 37 °C durante 10 minutos en presencia de 2 µl de *Proteinasa K*. A continuación, se procedió a la transformación con 5 µl del total de la reacción de una alícuota de células competentes *One Library Efficiency DH5α Chemically Competent Cells* (Invitrogen<sup>TM</sup>) como se describe en *Materiales y métodos, apartado II.4.2*.

Las construcciones generadas fueron testadas mediante secuenciación (*Materiales y Métodos, apartado II.3.6.*) antes de llevar a cabo la transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 (Weigel *et al.*, 2006) conteniendo independientemente las construcciones pK7WGF2-*FaPRE1* y pK7WGF2-*FaEOBII*, y el vector vacío pK7WGF2 y (usado como control); y cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 transportando el vector supresor de genes de silenciamiento pTBSV-*p19* (Voinnet *et al.*, 2003) fueron crecidos a 28 °C en medio LB con los antibióticos apropiados hasta alcanzar una DO<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 and 1 mM acetosiringona) ajustando su concentración final entre 0,5 y 0,8. Las suspensiones con las construcciones de interés y los plásmidos vacíos fueron mezcladas con las

células que contenían el vector pTBSV-*p19* a partes iguales e incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente entre 2 y 4 horas. Transcurrido este tiempo, las suspensiones bacterianas fueron infiltradas de forma independiente a través de la cara abaxial de la hoja con una jeringa sin aguja. Las hojas infiltradas fueron recolectadas cuatro días después de su inyección. Para la localización de los núcleos celulares de manera precisa, pequeños fragmentos de hojas de *N. benthamiana* fueron incubados en oscuridad con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) durante 5 minutos y lavados luego con agua destilada. Estos fragmentos de hoja tratados fueron observados para la localización de la proteína GFP con un microscopio de epifluorescencia LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss, Inc., Germany). Los parámetros de excitación/emisión usados para la visualizar la fluorescencia de la proteína GFP y el DAPI fueron de 488/500–515 nm y 405/449–461 nm respectivamente.

DAPI es una tinción fluorescente que emite fluorescencia azul tras su unión selectiva al surco menor del ADN de doble cadena. Este compuesto se une fuertemente a las regiones de ADN ricas en A-T donde su fluorescencia es aproximadamente 20 veces mayor que en estado libre. Su selectividad de unión al ADN y su alta permeabilidad permite la tinción de núcleos celulares con poco ruido de fondo del citoplasma. DAPI es una tinción nuclear clásica usada en microscopía de inmunofluorescencia.

## II.11. Escrutinio de interacción mediante doble híbrido en levadura

En el estudio de doble híbrido de levadura, el marco abierto de lectura del gen *FaPRE1*, subclonado en el vector pDONR<sup>TM</sup>221, fue recombinado mediante una reacción LR Gateway<sup>TM</sup> en el vector “bait” pBDGAL4 (pDEST<sup>TM</sup>32; Invitrogen<sup>TM</sup>) y el vector “prey” pADGAL4 (pDEST<sup>TM</sup>22; Invitrogen<sup>TM</sup>) independientemente (*Materiales y Métodos. Apartado II.10*). Previamente, para llevar a cabo el escrutinio mediante el doble híbrido de levadura, en el vector “prey” pADGAL4 (pDEST<sup>TM</sup>22; Invitrogen<sup>TM</sup>) se recombinó una librería de expresión de ADN copia procedente de frutos de fresa *Fragaria* × *ananassa* en estadio rojo (pDEST<sup>TM</sup>22:RED) (cedida por cortesía del Dr. Schaart; Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands). Los vectores “bait” y “prey” resultantes fueron transformados en las cepas de levadura PJ69-4a (*MATa*) y PJ69-4α (*MATα*) respectivamente según describe James *et al.* (1996); y usados en los experimentos de doble híbrido de levadura tal y como describe Folter *et al.* (2005). Las levaduras transformantes obtenidas fueron seleccionadas en placas con medio SD (*Materiales y Métodos, apartado I.2.3.1, apéndice 2 y 3*) en ausencia de triptófano y leucina, respectivamente, y comprobadas por PCR con cebadores específicos (*Materiales y métodos, apartado II.3.5.2, tabla 4*).

### II.11.1 Ensayos de auto-activación

Antes de llevar a cabo el ensayo del doble híbrido de levadura, la cepa de levadura que contiene la construcción con nuestro gen de interés (“cebo”) debe ser examinada mediante ensayos de auto-activación. La auto-activación se define como la activación detectable de un gen reportero presente en la construcción “cebo” en ausencia de cualquier interacción con la “presa”. Las interacciones de fuerza débil a intermedia en los ensayos de auto-activación se aceptan como ruido de fondo, ya que las interacciones “cebo-presa” específicas confieren uniones más fuertes que las auto-activaciones. Si el gen reportero que se emplea es HIS3, el ruido de fondo de la auto-activación puede ser suprimido mediante la adición de 3-AT en el medio de selección de crecimiento de las levaduras. El 3-AT es un inhibidor competitivo de HIS3.

Los ensayos de auto-activación de todos los “cebos” objeto de estudio deben ser llevados a cabo de forma simultánea en placas que contengan diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). Por ejemplo, se pueden utilizar una serie de titulación con concentraciones de 3-AT desde 0, 1, 2, 4, 8, 16...hasta 128 mM. La concentración más baja (concentración inhibitoria mínima) de 3-AT que suprime el crecimiento en esta prueba se utiliza para los posteriores ensayos de interacción del doble híbrido de levadura, ya que evita el ruido de fondo del crecimiento de las autoactivaciones, mientras que las verdaderas interacciones siguen siendo detectables.

### II.11.2. Escrutinio de interacción con una librería de expresión

La levadura PJ69-4 $\alpha$  conteniendo la construcción de interés (pDEST<sup>TM</sup>32:*FaPRE1*) fue transformada con la librería de expresión procedente de fruto rojo de fresa (pDEST<sup>TM</sup>22:*RED*) cedida por el Dr. Jan Schaart (Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen University and Research Centre). Las levaduras diploides obtenidas fueron plaqueadas en medio SD en ausencia de leucina y triptófano para determinar la frecuencia de transformación y en medio SD en ausencia de leucina, triptófano e histidina, suplementado con 3-AT en concentraciones crecientes (1, 5, 10 ... 150 mM), para seleccionar las interacciones específicas y descartar las interacciones débiles.

### II.11.3. Identificación de transformantes diploides positivos de levadura

De las colonias de levaduras diploides crecidas en medio selectivo y en las que se establecen interacciones “cebo-presa”, las secuencias de las respectivas “presas” se pueden obtener mediante PCR de dichas colonias. Así, la PCR se realizó con los cebadores PRO500 (5'- GCG



TTT GGA ATC ACT ACA GG -3') y PRO501 (5' - AAC CTC TGG CGA AGT AGA CC -3') (*Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2.; Tabla 3*) diseñados sobre el vector pDEST<sup>TM</sup>22. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron identificadas mediante BLAST a través de los servidores del NCBI y [www.strawberrygenome.org](http://www.strawberrygenome.org).

## II.12. Purificación de proteínas y determinación de motivos de unión al ADN

El ensayo de determinación de motivos de unión al ADN fue llevado a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (UG-CNB) bajo la supervisión del Dr. José M. Franco-Zorrilla.

La construcción para obtener fusiones traduccionales de la proteína de interés FaEOBII con la proteína de unión a la maltosa (MBP), se obtuvo clonando la secuencia codificante completa del factor de transcripción FaEOBII pDEST-TH1 (cedido por Dr. José M. Franco-Zorrilla y Dr. Roberto Solano del Centro Nacional de Biotecnología; CNB-CSIC) mediante una reacción de recombinación de tipo LR Gateway<sup>TM</sup>. El fragmento de interés se obtuvo mediante PCR empleando los cebadores específicos attB-EOBII (*Materiales y Métodos, apartado II.3.5.2, tabla 4*) y se subclonó en el vector pDONR<sup>TM</sup>221. La construcción recombinante obtenida se comprobó mediante PCR y secuenciación y, posteriormente, se introdujo en la cepa BL-21 de *E. coli*. La expresión y purificación de la proteína recombinante MBP::FaEOBII se realizó como describe el protocolo del sistema de purificación pMAL (New England Biolabs). Los motivos de unión a ADN del factor de transcripción FaEOBII fueron determinados empleando una plataforma de microarray de proteínas de unión a secuencias cis-reguladoras (PBM11) como describe Godoy *et al.* (2011). De forma resumida, se incubó 1 mg de proteína recombinante durante 2.5 h a temperatura ambiente con un microarray de secuencias de ADN de doble cadena que contenía todas las combinaciones posibles de secuencias de 11-pb (~4.2 millones de secuencias) ordenadas en ~240000 puntos. Después de sucesivos lavados, el microarray fue incubado con un anticuerpo primario anti-MBP y con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (DyLight 549). Finalmente, los cristales fueron escaneados a 5 mm en un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) y las intensidades de las señales captadas fueron cuantificadas con el programa GenePix Pro 5.1. Todos los pasos llevados a cabo (síntesis *in situ* de la doble cadena de ADN, incubaciones, lavados de la proteína recombinante y anticuerpos, escaneado, cuantificación y determinación de los motivos de unión a ADN) fueron realizados según describe Godoy *et al.* (2011).

### II.13. Aislamiento y *trans*-activación de promotores

Los ensayos de *trans*-activación de promotores fueron llevados a cabo durante una estancia en la Universidad de Amsterdam (UvA) bajo la supervisión del grupo de investigación del Dr. R.C. Schuurink.

Para la obtención de la construcción pKGWFS7-*pCAD*, se aisló mediante PCR un fragmento de 2637 pb correspondientes al promotor del gen *FvCAD1*, incluyendo la región 5'-UTR, usando cebadores específicos diseñados para tal propósito (Tabla 4). Se empleó la enzima de alta fidelidad *iProof<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase* (Bio-Rad) y el programa de PCR recomendado por la casa comercial teniendo en cuenta la procesatividad de la enzima y el tamaño del fragmento a amplificar (*Materiales y Métodos, apartado II.3.5.*). El fragmento resultante fue clonado corriente arriba del gen reportero GUS contenido en el vector binario pKGWFS7.0 (*Materiales y Métodos, apartado I.2.6.*) empleando la tecnología *Gateway*<sup>®</sup> y manteniendo el mismo marco de lectura.

El análisis de las posibles cajas *cis*-reguladoras presentes en el promotor *pCAD* se llevó a cabo con la base de datos PLACE ([www.dna.affrc.go.jp](http://www.dna.affrc.go.jp)) (Higo *et al.*, 1999) y la integridad de su secuencia fue comprobada por secuenciación.

Los ensayos de *trans*-activación del promotor fueron llevados a cabo de manera transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello se empleó pKGWFS7-*pCAD* como construcción reportera y la construcción pK7WG2-*FaEOBII* como construcción efectora. Las construcciones empleadas pODO1::GUS, 35S::PhEOBII, 35S::LUC y 35S::AN2 (Verdonk, 2006; Van Moerkercke *et al.*, 2011) fueron cedidas por el grupo de investigación del Dr. R.C.Schuurink de la Universidad de Amsterdam (UvA). Los ensayos de actividad GUS y LUC fueron llevados a cabo como describe Van Moerkercke *et al.* (2011).

Cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) conteniendo por separado las respectivas construcciones efectoras y reporteras citadas anteriormente fueron crecidos a 28 °C en medio LB con los antibióticos apropiados hasta estar saturados. Posteriormente, fueron diluidos en tampón de infiltración (50 mM ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES), 0,5 % glucosa, 2 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 100 μM acetosiringona, pH 5.8) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,3 antes de infiltrar las hojas de *N. benthamiana*. Combinaciones apropiadas de los cultivos de las construcciones portadoras y efectoras fueron coinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* mantenidas en cámara bajo condiciones de luz y temperatura adecuadas durante 48 horas. Las áreas infiltradas fueron marcadas y, finalizado el periodo en cámara, se recogieron 5 discos de hoja por muestra. Para

cada combinación efector/reportero fueron infiltradas seis hojas en dos plantas diferentes (n=6), y cada experimento fue repetido, al menos, dos veces. Como normalizador del experimento, las hojas se coinfiltraron con *A. tumefaciens* GV3101 transformado con la construcción 35S:LUC. Los discos de hoja recolectados fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido.

La extracción se llevó a cabo a partir de 50 mg de tejido pulverizado en presencia de 150 µl de tampón de lisis frío (CCLR: 25 mM Tris pH 7.8; 2 mM DTT; 2 M ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetra-acético (CDTA); 1 % Triton<sup>®</sup>-X-100; 10 % glicerol) suplementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras se mezclaron bien en vortex durante 30 seg y se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 13000 g. Los sobrenadantes obtenidos se recogieron y se mantuvieron en frío. Después de un período de incubación a 37 °C durante 30 min, el ensayo de actividad GUS de los extractos crudos obtenidos fue determinado espectrofotométricamente usando 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido (MUG) como sustrato (1 mM MUG en tampon CCLR suplementado con 10 mM β-mercaptoetanol). Las medidas fueron tomadas en un fluorómetro *FluoroCount Microplate* (Packard BioScience Company, <http://www.packardinstrument.com>) usando unos parámetros de excitación a 360 nm y de emission a 460 nm. El ensayo de actividad LUC se llevó a cabo con 20 µl del extracto crudo en 80 µl de tampon de ensayo de la luciferasa (20 mM Tricina, 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33 mM DTT, 270 µM co-enzima A, 530 µM ATP, 470 µM D-Luciferina, pH 7.8) según Van Leeuwen *et al.* (2000) y medido en un fluorómetro *FluoroCount Microplate* (Packard BioScience Company, <http://www.packardinstrument.com>) usando unos parámetros de emisión de 560 nm (Van Moerkercke *et al.*, 2011).

## II.14. Ensayos histológicos

### II.14.1. Recolección y fijación del material biológico

El material biológico empleado se recogió “*in situ*” en el invernadero a partir de plantas de fresa (*Fragaria × ananassa* “Chandler”). Los tejidos vegetativos recolectados fueron hojas, estolones, raíces y pedicelos. También se recogieron botones florales y frutos completos (receptáculos + aquenios) en diferentes estadíos de desarrollo (V1, V3, B, R, SM y SN). En cualquier caso, la muestra correspondiente se separó de la planta con unas tijeras y posteriormente se dividió con un bisturí estéril en secciones longitudinales y transversales lo más pequeñas posible dependiendo del tejido.

Las secciones obtenidas se introdujeron inmediatamente en un tubo de 50 ml conteniendo fijador Bouin (ácido pícrico saturado 75 % (v/v), formaldehído 25 % (v/v) y ácido acético

glacial 0.05 % (v/v)). Las muestras fijadas en Bouin se mantuvieron en el fijador entre 12 y 24 horas como máximo. Cuando se observó que la penetración del fijador en los tejidos no fue la adecuada, hecho que se manifiesta porque los mismos flotan en la solución, el tubo con el fijador y las muestras fue introducido en una campana de vacío para desgasear los tejidos y favorecer la penetración del fijador. Transcurrido el periodo de fijación, las secciones se lavaron abundantemente con H<sub>2</sub>O hasta eliminar el exceso de fijador.

#### **II.14.2. Inclusión en parafina**

Los tejidos empleados en microscopía óptica se incluyeron en parafina (Paraplast Plus; Sherwood Medical) después de ser sometidos a una fase de deshidratación e inclusión progresiva.

La deshidratación de las muestras se realizó de forma progresiva a lo largo de dos días. Inicialmente, éstas se introdujeron sucesivamente durante 20 minutos cada vez en alcohol al 30 % y 50 % a 4 °C. Inmediatamente después, las muestras se dejaron durante 12 horas en etanol al 70 % a 4 °C. Transcurrido este tiempo, los tejidos se volvieron a sumergir sucesivamente durante 20 minutos cada vez en etanol al 85 %, 90 %, 100 % y 100 % a temperatura ambiente.

Terminada la deshidratación, las muestras se transfirieron a una mezcla de etanol y butanol terciario en las siguientes relaciones: 3:1, 1:1 y 1:3, durante 30 minutos cada vez y a temperatura ambiente. Seguidamente, el material se introdujo exclusivamente en butanol terciario al 100 % durante 30 minutos a 30 °C.

A continuación, los tejidos se fueron incluyendo progresivamente en una mezcla de butanol terciario y parafina en una mezcla de butanol terciario saturado con parafina a 30 °C durante 4-6 horas a 30 °C y, finalmente, en butanol terciario saturado con parafina a 42 °C durante 12 horas. El progresivo aumento de la temperatura favoreció la infiltración de los tejidos fijados con parafina.

Llegados a este punto, y para eliminar cualquier resto de butanol terciario presente en los tejidos, se dieron al menos cuatro pasos sucesivos en parafina a 60 °C para favorecer la evaporación. El primer paso por parafina fue de tres días de duración y los siguientes de 24 horas.

### II.14.3. Obtención de bloques y cortes histológicos

Los tejidos incluidos en parafina se individualizaron en bloques independientes. Para ello, se aislaron uno a uno sobre moldes metálicos (Miles Inc.) y éstos se dispusieron sobre una placa térmica (“Plactronic” Selecta) a 60 °C. Sobre ellos, se vertió parafina líquida licuada durante varias horas en una estufa a 60 °C, y sobre ella, a su vez, se depositó una rejilla plástica (Miles Inc.) sobre la que se dejó solidificar la parafina lentamente a temperatura ambiente. Cuando se formó una película gruesa de parafina solidificada, el molde se retiró de la placa térmica y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Transcurridos unos 5 minutos, el molde se introdujo sucesivamente a 4 °C durante 10 minutos y a -20 °C durante 20 minutos. Después de este tiempo, el bloque de parafina conteniendo el tejido y el soporte plástico se liberó del molde metálico. Los bloques de parafina se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Las secciones de los tejidos incluidos en parafina se obtuvieron cortando los bloques preparados anteriormente con un microtomo (Leica RM 2025). El grosor de las secciones obtenidas fue, según el tejido, entre 8 y 10 µm. Antes de proceder al corte de cada bloque, éste se mantuvo durante 10 minutos a -20 °C para endurecerlo y favorecer el proceso. Además, fue siempre preciso tallar el bloque previamente en forma de trapecoide con un bisturí, lo que facilitó el corte de las secciones y evitó su rotura.

### II.14.4. Montaje de los cortes histológicos

Para el montaje de las secciones obtenidas a partir de bloques de parafina, se dispuso una serie de portaobjetos sobre una placa térmica a 42 °C. Sobre ellos se añadió aproximadamente 300 µl de gelatina al 1 % (p/v) (el volumen varió dependiendo del tamaño del corte que se empleó en el montaje), y los tejidos cortados previamente se dispusieron sobre dicha solución (dos cortes en cada portaobjeto). Se dejaron transcurrir unos 5 minutos para que los cortes se hidrataran bien y se desplegaran completamente sobre el portaobjetos, e inmediatamente después se retiró la solución de gelatina por inversión y el portaobjetos correspondiente se mantuvo nuevamente sobre la placa a 42 °C durante 10 minutos más. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos se dispusieron verticalmente en una estufa a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, los portaobjetos con los cortes adheridos se retiraron de la estufa y en estas condiciones se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

## II.14.5. Tinciones histológicas

Todos los tejidos estudiados y sometidos a las diferentes tinciones que se enumeran a continuación fueron visualizados en un microscopio PALM MicroBeam (Zeiss).

### II.14.5.1. Tinciones histológicas generales

#### *Tinción con azul de toluidina*

La tinción con azul de toluidina (al 1 % (p/v) en solución de bórax al 1 % (p/v) en H<sub>2</sub>O) se empleó generalmente para teñir y comprobar el estado de los cortes de tejidos realizados debido a su capacidad de teñir inespecíficamente cualquier estructura y componente celular.

La tinción se llevó a cabo incubando los tejidos, previamente desparafinados e hidratados, durante 5 minutos a temperatura ambiente. En general, el tiempo de incubación se optimizó en el momento de su uso dependiendo del desarrollo del color en la tinción. Transcurrido el tiempo determinado, las muestras se lavaron abundantemente para eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes, y se montaron empleando Entellan (Merck) como resina de montaje.

### II.14.5.2. Tinciones histológicas de hidratos de carbono

#### *Tinción con ácido peryódico y reactivo de Schiff (PAS, periodic acid-Schiff)*

Este tipo de tinción permite teñir inespecíficamente y localizar físicamente cualquier tipo de hidrato de carbono que forme parte de la composición del tejido sometido a estudio. El anión peryodato es un agente oxidante soluble en H<sub>2</sub>O con una alta reactividad por los grupos 1,2-diol mientras que el reactivo de Schiff contiene un compuesto hidrofílico y catiónico derivado de la Fuchsina y sulfito aniónico. El reactivo de Schiff no es un colorante específico de aldehídos sino que la selectividad de la tinción se alcanza mediante su combinación con peryodato. Así, este oxidante reacciona con los grupos 1,2-dioles generando dialdehídos que se colorean en presencia de reactivo de Schiff. El color se consigue al eliminar el sulfito con H<sub>2</sub>O y por generación del cromóforo rosa trifenilmetano (Horobin, 1988).

Los tejidos sometidos a esta tinción fueron previamente desparafinados e hidratados y, a continuación, se incubaron con ácido peryódico 1 %-0,8 % (p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la muestra se lavó generosamente con H<sub>2</sub>O destilada durante 5 minutos y se incubó con reactivo de Schiff durante 20 minutos. A continuación, los tejidos se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada durante 5 minutos nuevamente. Las

muestras teñidas se deshidrataron con tratamientos consecutivos de 30-60 segundos en etanol al 90 %, 100 % y xileno y, posteriormente, se montaron empleando Entellan como resina de montaje.

## II.15 Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con los programas GraphPad InStat y SPSS Statistics 17.0. Los análisis estadísticos de caracteres cuantitativos se llevaron a cabo mediante un test “t de Student” donde los valores estadísticos de significación fueron  $*P\text{-value} \leq 0.05$ ,  $**P\text{-value} \leq 0.01$  y  $***P\text{-value} \leq 0.001$  o mediante un análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba de contraste (post-hoc de Scheffe) donde el valor estadístico de significación fue  $p < 0.05$ .

Se emplearon diagramas de Venn para la representación esquemática de las comparaciones de las condiciones estudiadas empleando la plataforma microarray. Estas representaciones gráficas se realizaron con la herramienta “VENNY online tool” disponible desde 2007 en <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Oliveros, JC).

Debido a los cambios fenotípicos observados en las plantas transgénicas sobreexpresando el gen *FaPRE1* (pK7WG2-*FaPRE1*) (*Materiales y métodos, apartado II.10.1.2.*) y para cuantificar por microscopía óptica los posibles cambios celulares en dichas plantas frente a plantas control sin transformar, se realizaron secciones transversales y longitudinales del tejido parenquimático correspondiente al botón floral de ambos tipos de plantas. La visualización y adquisición de las imágenes de las secciones estudiadas se llevó a cabo con un fotomicroscopio PALM MicroBeam (Zeiss) y el programa AxioVision versión 4.8. Los estudios cuantitativos de tamaño y forma celular fueron llevados a cabo en ambos grupos muestrales. Alrededor de 1000 células por muestra fueron escrutadas con el programa ImageJ versión 1.40G (NIH), obteniendo datos del área, perímetro y coeficiente de la forma celular para cada célula escrutada. El coeficiente de forma celular indica la forma de las células. Así, cuanto más próximo a 1 sea su valor, más esféricas son las células analizadas. Finalmente, el análisis estadístico de todos los datos obtenidos se llevó a cabo como se describe anteriormente (*Materiales y métodos, apartado II.15*).

## **CHAPTER 1**

# **Functional characterization of FaNCED1, a key enzyme in the hormonal regulation of strawberry fruit ripening**





**CHAPTER 1****Functional characterization of FaNCED1, a key enzyme in the hormonal regulation of strawberry fruit ripening****Abstract**

Abscisic acid is an isoprenoid plant hormone, key in regulating maturation program of non-climacteric fruit. In plants, ABA is synthesized in the plastidial MEP pathway and the final plastid-localized step in its biosynthesis is catalyzed by a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) by cutting C<sub>40</sub> carotenoid precursors (9-*cis*-neoxanthin and 9-*cis*-violaxanthin) to generate the proximal ABA C<sub>15</sub> precursor, xanthoxin, which is then further oxidized to ABA in the cytosol via abscisic aldehyde. NCEDs are encoded by multigene families in all species analyzed, with differential expression of specific family members contributing to ABA synthesis in different contexts. In strawberry fruit receptacle, it has been identified *FaNCED1* gene whose expression pattern during fruit receptacle development and ripening is in accordance with the content of ABA. The full-length *FaNCED1* cDNA was cloned and expressed in *E. coli* and its catalytic activity was analyzed with C<sub>40</sub> carotenoids precursors. The semi-purified FaNCED1 enzyme showed activity with *cis*-precursors but not with all-*trans*-precursor. When *FaNCED1* gene expression was transiently downregulated in the fruit receptacle by agroinfiltration, the ABA production was significantly reduced, anthocyanin content was dramatically reduced and the onset of maturation was delayed. The same result was achieved by blocking the catalytic activity of FaNCED1 by injecting the inhibitor nordihydroguaiaretic acid (NDGA). On the other hand, water stress triggered the maturation program inducing *FaNCED1* gene expression and increasing the content of ABA and anthocyanin accumulation in strawberry fruit receptacle. The results suggest that the *FaNCED1* gene has a significant role in the production of ABA and can be used as a potent biotechnological tool to discover and control the underlying ripening mechanism.

**Introduction**

Fleshy fruits are important worldwide crops and the regulation of fruit ripening is a key challenge in fleshy fruit production. Fruit ripening involves several changes in physiological and biochemical catabolism, influencing quality-related factors, such as flavour, texture, color and aroma. Fleshy fruits have been classified into two group based on the type of fruits ripening, climacteric and non-climacteric (Giovannoni, 2001). Traditionally, climacteric fruits are

characterized by a burst of ethylene production required for normal fruit ripening and senescence (Giovannoni, 2001; Alexander and Grierson, 2002; White, 2002; Giovannoni, 2004; Klee and Giovannoni, 2011). On the other hand, non-climacteric fruits are characterized by the lack of a peak in ethylene production during ripening (Chervin *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2006). In both climacteric (Vendrell and Buesa, 1989) and non-climacteric (Kojima, 1996; Kondo and Inoue, 1997; Kondo and Tomiyama, 1998) fruits, ABA content is very low in unripe stages, but increases during fruit ripening. In strawberries, a non-climacteric fruit, ABA content gradually accumulates with sugar accumulation and acidity decreases during the late stage of fruit development (Manning, 1998; Jiang and Joyce, 2003). Besides, several studies in grape showed a correlation between ABA and pigment content in the pericarp (Kojima, 1996; Kato *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2006). Thus, ABA began to be regarded as a candidate in the hormonal regulation of non-climacteric fruit ripening.

Abscisic acid (ABA) is a sesquiterpenoid molecule made by organism across kingdoms (Ortani and Kiyota, 2003; Bruzzone *et al.*, 2007, Takezawa *et al.*, 2011) and acts as a hormone to regulate diverse processes including seed development, dormancy, germination, root growth and seedling development (Zeevaert and Creelman, 1988; Finkelstein *et al.*, 2002). ABA is also a central regulator of plant adaptation to biotic (Fujita *et al.*, 2006) and abiotic stressors, particularly dehydration and salinity, through mechanisms including the production of osmoprotective proteins and metabolites, and the regulation of stomatal conductance (Zhu, 2002; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007) but also regulates fruit ripening (Kondo *et al.*, 2002; Jiang and Joyce, 2003; Giovannoni, 2007; Galpaz *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2011). Many details of ABA biosynthesis, transport, catabolism, and ABA-mediated effects on global transcription and metabolism have been elucidated (Nambara and Marion-Poll, 2005; Christmann *et al.*, 2006; Verslues and Zhu, 2007; Urano *et al.*, 2009). Genomic resources of *Arabidopsis*, in particular, have enabled the identification of key components of ABA signal transduction, including protein kinases, phosphatases, transcription factors, RNA processing factors, proteasome components, chromatin remodelling proteins, and histone deacetylases that mediate epigenetic regulation (Hirayama and Shinozaki, 2007; Chinnusamy and Zhu, 2009; Cutler *et al.*, 2010). However, many significant gaps in our understanding of ABA signal transduction still exist.

ABA is indirectly derived from C<sub>40</sub>-*cis*-epoxycarotenoids, the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) cleaves C<sub>40</sub>-*cis*-epoxycarotenoids to produce C<sub>25</sub>-apocarotenal and xanthoxin, which is the direct C<sub>15</sub> precursor of ABA (Zeevaert and Creelman, 1998; Cutler and Krochko, 1999; Liotenberg *et al.*, 1999). Biochemical studies indicate that the reaction catalyzed by the plastid enzyme NCED is the key regulatory step in ABA biosynthesis (Kende

and Zeevaart, 1997; Seo and Koshiba, 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005). The biosynthetic pathway of ABA in higher plants has been largely delineated (Nambara and Marion-Poll, 2005; Marion-Poll and Leung, 2006). Briefly, the early precursor of ABA, isopentenyl diphosphate, is synthesized primarily in plastids from glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate via the methylerythritol phosphate (MEP) pathway. This leads to the successive production of phytoene and lycopene as the intermediates, the latter of which is cyclized and hydroxylated to form zeaxanthin, the first oxygenated carotenoid. The subsequent conversion of zeaxanthin to either violaxanthin or neoxanthin also occurs in the plastid. In *Arabidopsis*, both violaxanthin and neoxanthin are alternative substrates *in vivo* of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) to produce C<sub>25</sub>-epoxy-apo-aldehyde/C<sub>25</sub>-allenic-apo-aldehyde and xanthoxin (C<sub>15</sub>) (Tan *et al.*, 1997; Burbidge *et al.*, 1999; Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 2006), the first cytoplasmic precursor for the catalytic conversion to ABA. The first *NCED* cDNA was obtained from the ABA-deficient Vp14 mutant of maize (Tan *et al.*, 1997). Subsequently, sequences homologous to this gene were obtained from *Lycopersicon esculentum* designated as *LeNCED1* (Burbidge *et al.*, 1997). More recently, several *NCED* genes have been cloned and characterized in different plant species, including strawberry (Jia *et al.*, 2011), tomato (Zhang *et al.*, 2009), stylo (*Stylosanthes guianensis*) (Yang and Guo, 2007), citrus (Rodrigo *et al.*, 2006), *Arabidopsis thaliana* (Iuchi *et al.*, 2001), cowpea (Iuchi *et al.*, 2000), avocado (*Persea americana*) (Chernys and Zeevaart, 2000) and bean (*Phaseolus vulgaris*) (Qin and Zeevaart, 1999), as well as, in the parasitic plant giant dodder (*Cuscuta reflexa*) (Qin *et al.*, 2008). In some species, *NCED*-like genes comprise a small multigene family, with only a subgroup involved in stress responses and in the regulation of ABA biosynthesis (Chernys and Zeevaart, 2000; Tan *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2006).

The expression of *NCED* genes, and the subsequent regulation of ABA biosynthesis, has been studied extensively in several plant species. While, in general water stress is known to induce the expression of *NCED* genes, which is accompanied by an accumulation of ABA (Schwartz *et al.*, 1997; Burbidge *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000a; Xiong and Zhu, 2003; Nambara and Marion-Poll, 2005; Yang and Guo, 2007) and an increase of the corresponding *NCED* protein in leaves (Qin and Zeevaart, 1999), the patterns of expression of *NCED* in other organs or under other stresses are not well known. Three *NCED*-like genes were captured in avocado, and *PaNCED1* and *PaNCED3* were found to be induced in ripened fruits (Chernys and Zeevaart, 2000). In the *Arabidopsis* five-*NCEDs*-gene family, *AtNCED2* and *AtNCED3* were expressed in roots (Tan *et al.*, 2003), whereas *AtNCED6* and *AtNCED9* expression could be detected in seeds (Lefebvre *et al.*, 2006). *VuNCED1* from cowpea was strongly induced by salt stress (Iuchi *et al.*, 2000). In *Stylosanthes guianensis*, *SgNCED1* transcription and ABA accumulation could be induced in leaves and roots under dehydration, salt, chilling and drought stress (Yang and Guo,

2007). At developmental stage, *LeNCED1* gene from tomato was highly expressed at the breaker stage (Zhang *et al.*, 2009). Moreover, the overexpression of the *NCED* gene has been shown to enhance ABA accumulation and drought tolerance in transgenic plants (Thompson *et al.*, 2000b; Iuchi *et al.*, 2001; Qin and Zeevaart, 2002; Zhang *et al.*, 2008). These results provide strong evidence for the regulatory role of *NCED* in ABA biosynthesis under stress conditions. However, the regulation of ABA biosynthesis in strawberry during the processes of development, maturation and senescence was poorly understood until 2011 (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011).

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) constitutes a high-value food crop that is cultivated almost worldwide and is one of the most popular fruits that is consumed as a fresh or manufactured product. The fruit, an aggregate of numerous ovaries, is composed of the seeds (achenes) embedded in the epidermis of the swollen receptacle tissue. Strawberries do not develop properly if seeds have not been formed (Perkins-Veazie, 1995). The phytohormone auxin has been regarded as the main signal molecule coordinating the growth and initiation of ripening in strawberry fruit (Perkins-Veazie, 1995). During the early stages of fruit development, the auxins synthesized in the achenes promote fruit growth, but actual strawberry ripening is triggered by the decline in the levels of auxin in the receptacle caused by the cessation of auxin synthesis and transport from the maturing achenes and by the increase in the levels of ABA in the receptacle (Perkins-Veazie, 1995; Jiang and Joyce *et al.*, 2003). Many metabolic changes take place throughout strawberry fruit growth and ripening, such as the degradation of chlorophyll, the accumulation of anthocyanin, softening, the metabolism of organic acid and sugars, hormonal changes and the production of flavor compounds (Martínez *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012; Ornelas-Paz J de J *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2013).

In this study, our aim was the functional characterization of *FaNCED1* as the key enzyme of ABA biosynthesis pathway and the determination of ABA as the central regulatory hormone of ripening process in strawberry fruit receptacles. Besides, transcriptomic studies using a custom-made oligo-based microarray platform allowed us the identification of genes of interest whose expression during strawberry fruit ripening is positively regulated by ABA, such as the R2R3-MYB transcription factor *FaMYB10* (Medina-Puche *et al.*, 2014) as well as the main genes involved in the MEP-pathway as regulatory points along ABA biosynthesis and their feedback regulation by ABA.

## Results

### Functional characterization of FaNCED1, the key enzyme in ABA biosynthesis pathway

#### *Identification of FaNCED1 gene by cDNA microarrays analyses*

Previous high-throughput analysis carried out in our research group comparing transcriptomes of green immature versus red-ripened strawberry receptacles using a cDNA-based strawberry microarray platform containing 2135 ESTs, allowed the identification of a putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*FaNCED1*) potentially involved in abscisic acid biosynthesis pathway, with high transcript levels in ripe fruits (data not shown) comparing to immature fruits. This, combined with its very low levels of expression in vegetative tissues, suggests that *FaNCED1* is directly involved in the metabolic processes occurring specifically in the receptacle during fruit ripening.

#### *Isolation of FaNCED1 full length cDNA and sequence analysis*

The full length sequence of *FaNCED1* from full-ripe red fruits of *Fragaria* × *ananassa* was obtained by RACE and RT-PCR technology. It has a 2450-bp full-length including an ORF of 1830-bp that encodes a carotenoid oxygenase peptide (InterPro scan; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) of 609 amino acids with a 201-bp 5'UTR and a 419-bp 3'UTR sequences. The deduced amino acid sequence of *FaNCED1* was a polypeptide of 66.96 kDa with the isoelectric point (pI) at 6.51. It was predicted a chloroplastic subcellular localization of *FaNCED1* by TargetP algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000) and a 49-aa putative chloroplast transit peptide was located at the N-terminus of the *FaNCED1* protein by ChloroP 1.1 algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) (Emanuelsson *et al.*, 1999). Four highly conserved histidine residues were located into the catalytic domain, required, in coordinating a non-heme iron, for the enzyme catalytic activity (Schwartz *et al.*, 1997). Moreover, an amphipathic  $\alpha$ -helix domain (LQRAASTALDMLEGALVS) was located at the N-terminus, responsible with the union of the protein with the membrane (Rodrigo *et al.*, 2005). The *FaNCED1* amino acid sequence was highly homologous to MhNCED from apple (77.6 % identity) and other NCEDs such as CcNCED5 (*Citrus clementina*; 76.8 %), GhNCED1 (*Gossypium hirsutum*; 75.1 %) and VvNCED2 (*Vitis vinifera*; 73.9 %). Multiple alignments of *FaNCED1* and other NCEDs (Table 1) were performed (Figure 1) and a phylogenetic tree was generated (Figure 2). The results showed that while *FaNCED1* was homologous to other all NCEDs, it was most closely related to MhNCED from apple, belonging to *Rosaceae* family as well as strawberry; and VvNCED2 and VvNCED1 from *Vitis vinifera*, a non-climacteric fruit as *Fragaria* × *ananassa*. Besides,

sequence alignments analysis showed that FaNCED1 had a high identity percent with CcNCED5 and AtNCED3 (71.4 %), that acts in response of water stress (Agustí *et al.*, 2007).

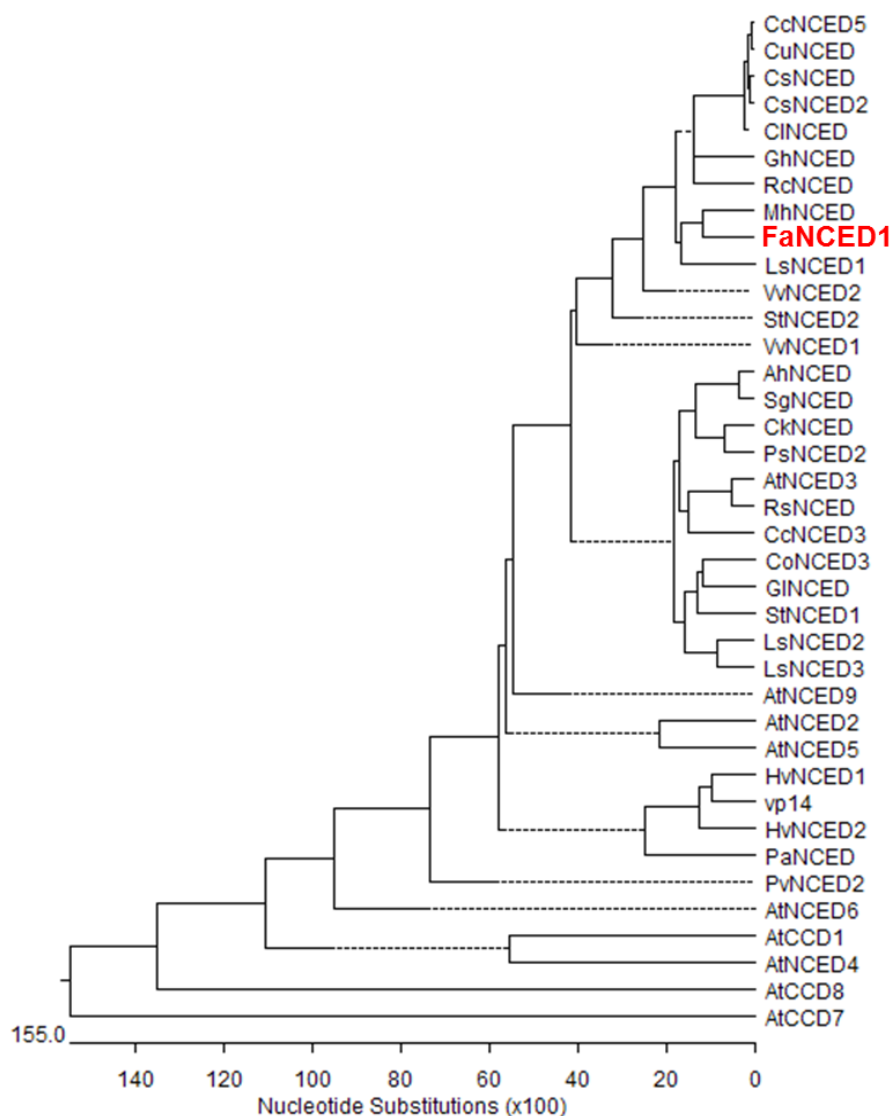
**Table 1: Carotenoid cleavage dioxygenase aminoacid sequences**

Gene	Species	Accession	Length
AhNCED	<i>Arachis hypogaea</i>	CAE00459	601
AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G63520	538
AtCCD7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G44990	629
AtCCD8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G32810	570
AtNCED3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY056255	599
AtNCED4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G19170	595
AtNCED5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G30100	589
AtNCED6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G24220	577
AtNCED9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G78390	657
CcNCED3	<i>Citrus clementina</i>	ABC26013	606
CcNCED5	<i>Citrus clementina</i>	ABC26010	609
CkNCED	<i>Caragana korshinskii</i>	ACU86971	605
CINCED	<i>Citrus limon</i>	BAE92962	587
CoNCED3	<i>Coffea canephora</i>	ABA43901	635
CsNCED2	<i>Citrus sinensis</i>	AAV89371	609
CuNCED	<i>Citrus unshiu</i>	BAE92960	587
FaNCED1	<i>Fragaria × ananassa</i>	XP_004293530	609
GhNCED	<i>Gossypium hirsutum</i>	ADG03462	608
GINCED	<i>Gentiana lutea</i>	AAS57838	604
HvNCED1	<i>Hordeum vulgare</i>	ABB71583	526
HvNCED2	<i>Hordeum vulgare</i>	ABB71584	592
LeNCED1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Z97215	605
LsNCED1	<i>Lactuca sativa</i>	BAE72090	585
LsNCED2	<i>Lactuca sativa</i>	BAE72091	607
LsNCED3	<i>Lactuca sativa</i>	BAE72092	583
MhNCED	<i>Malus hupehensis</i>	ACH85193	606
OsNCED5	<i>Oryza sativa</i>	AY838901	613
PaNCED	<i>Persea americana</i>	AAK00632	625
PaNCED3	<i>Persea americana</i>	AF224671	625
PsNCED2	<i>Pisum sativum</i>	BAC10550	601
PvNCED2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AAV82457	589
RcNCED	<i>Ricinus communis</i>	XP002519665	607
RsNCED	<i>Raphanus sativus</i>	BAF42336	597
SqNCED	<i>Stylosanthes quianensis</i>	AAV98512	602
StNCED1	<i>Solanum tuberosum</i>	AAT75151	603
StNCED2	<i>Solanum tuberosum</i>	AAT75152	580
zp14	<i>Zea mays</i>	NP001147527	631
VvNCED1	<i>Vitis vinifera</i>	AAR11193	610
VvNCED2	<i>Vitis vinifera</i>	AAR11194	605



**Figure 1: Sequence alignment of NCED proteins using the MultiAling Program (Corpet, 1998). The critical four histidine (H) residues are indicated by black dots. The  $\alpha$ -helix is indicated with a black line. Numbers indicate amino acid positions.**

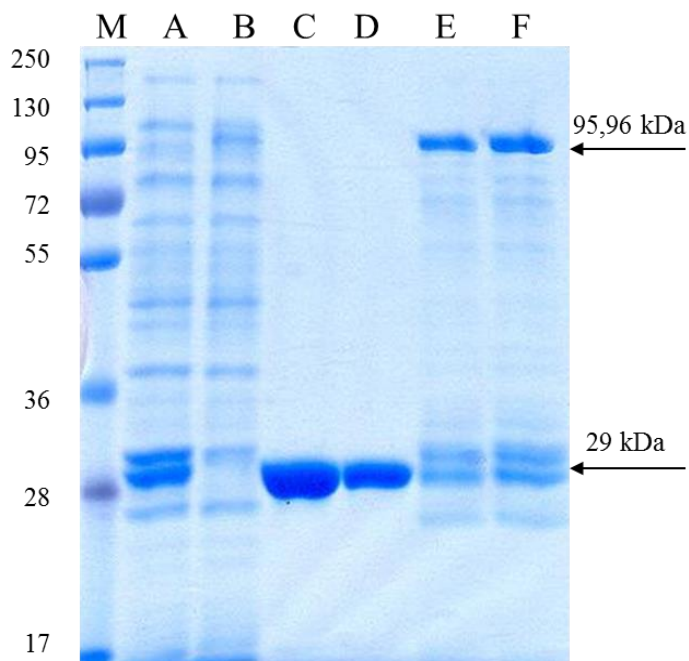




**Figure 2: Phylogenetic analysis of FaNCED1-related dioxygenase.** Full-length protein sequence were aligned using MegAlign for Windows 32 version 5.00 (DNASTAR). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs and the scale below indicates the number of nucleotide substitutions for both GenBank accession numbers are indicated in Table 1.

#### *Enzymatic characterization of FaNCED1 protein expressed in Escherichia coli*

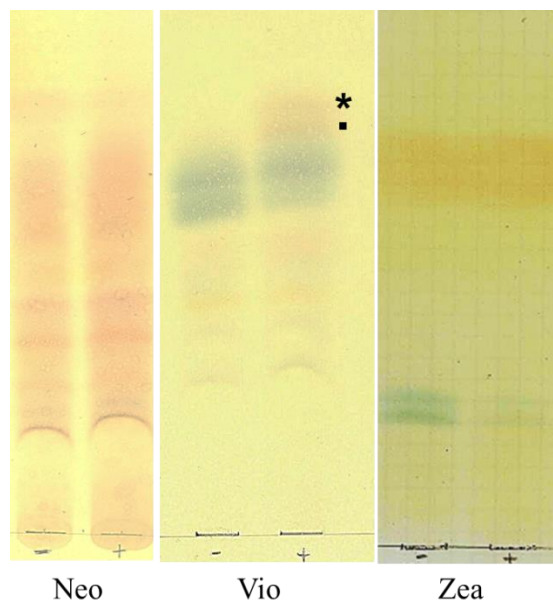
The coding region of the *FaNCED1* cDNA cloned in frame with GST-tag was used to express the recombinant FaNCED1 enzyme in *E. coli* BL21. Protein SDS-PAGE analysis showed a band that could not be detected in the control samples and presumably corresponded to the semi-purified recombinant FaNCED1-GST protein (Figure 3). The molecular mass of the FaNCED1-GST protein was 95.96 kDa (66.96 kDa plus 29 kDa of the GST-tag), which is coincident with the estimated size deduced from the full-length cDNA corresponding to FaNCED1.



**Figure 3: Purification of FaNCED1-GST recombinant protein from induced *E. coli* culture.** M: marker; A and B: sample induced with IPTG from empty vector (A) and pGEX:FaNCED1 (B); C and D: fraction 1 and 2 of purified GST tag from empty vector; E and F: fraction 1 and 2 of purified recombinant FaNCED1 protein; (GST = 29 kDa; FaNCED1 = 66.96 kDa (predicted); Expected size of FaNCED1:GST = 95,96 kDa).

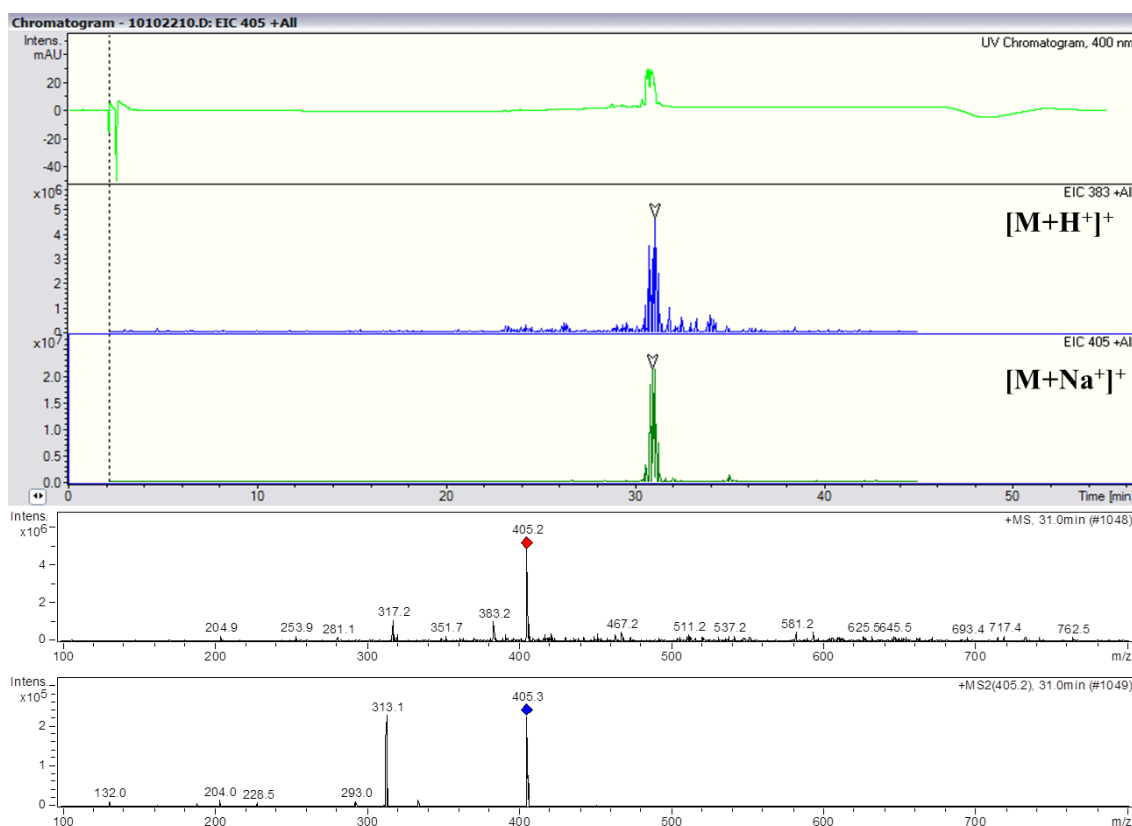
Different substrates were independently fed to *FaNCED1*-expressing *E. coli* to determine whether the recombinant FaNCED1 protein possessed enzymatic activity and to clarify its substrate preference. In all cases, assays were carried out with the FaNCED1-GST fusion protein from an induced crude *E. coli* BL21 extract and with the semi-purified fusion protein using a GST-tag resin. Best results were obtained with the fusion protein from induced crude extract. When all-*trans*-neoxanthin was added, the formation of products could not be detected, indicating that all-*trans*-neoxanthin is not a substrate of FaNCED1. Despite perform enzyme activity assays with zeaxanthin substrate in its *cis* configuration, no significant results were obtained. This could be expected since zeaxanthin is located upstream of FaNCED1 in the ABA biosynthesis pathway. By contrast, positive results were obtained when 9-*cis*-violaxanthin was used as a substrate of the enzymatic assay. In this latter case, two products were observed after running a TLC gel (Figure 4). Although neoxanthin is a well characterized substrate for NCED enzymes, it is required its *cis* configuration to work as a proper enzymatic substrate (Schwartz *et al.*, 1997). Thereby, substrate specificity of the cleavage reaction was determined. It appears that the 9-*cis* configuration was the primary determinant of cleavage specificity for the *in vitro*

assay. Thus, the xanthophyll precursor must have a 9-*cis* configuration to produce *cis*-xanthoxin and subsequently ABA, which is biologically active only in the *cis* form.



**Figure 4: Thin-layer chromatography of assays with (+) and without (-) crude extract containing fusion protein FaNCED1-GST.** Substrates and products were separated on a silica gel developed with 10 % *iso*-propanol in hexane. Neo: all-*trans*-neoxanthin; Zea: 9-*cis*-zeaxanthin; Vio: 9-*cis*-violaxanthin. The plates were sprayed with 2,4-dinitro-phenylhydrazine to detect xanthoxin and other aldehydes. The C<sub>25</sub> products are indicated by a dot (•) and the C<sub>15</sub> products are indicated by an asterisk (\*). The unlabelled spots are the carotenoids precursors.

Then, the products were extracted from silica gel spots and they were analyzed by LC-MS<sup>n</sup>. Only the C<sub>25</sub> product, C<sub>25</sub> epoxy apo-aldehyde, was identified. The theoretical mass of C<sub>25</sub> epoxy apo-aldehyde (C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>), enzymatic cleavage product of the substrate 9-*cis*-violaxanthin isomer, is 382.25. This value agrees with the experimentally determined mass spectrum of masses 383 [M+H<sup>+</sup>] and 405 [M+Na<sup>+</sup>] (Figure 5).



**Figure 5:** LC-MS<sup>n</sup> analysis of C<sub>25</sub> product isolated after TLC. The cleaved product catalysed by the recombinant FaNCED1 protein was identified in the UV chromatogram at 400 nm of absorption. The mass spectra showed the molecular ion at  $m/z$  383 ( $[M+H]^+$ ) and at  $m/z$  405 ( $[M+Na]^+$ ).

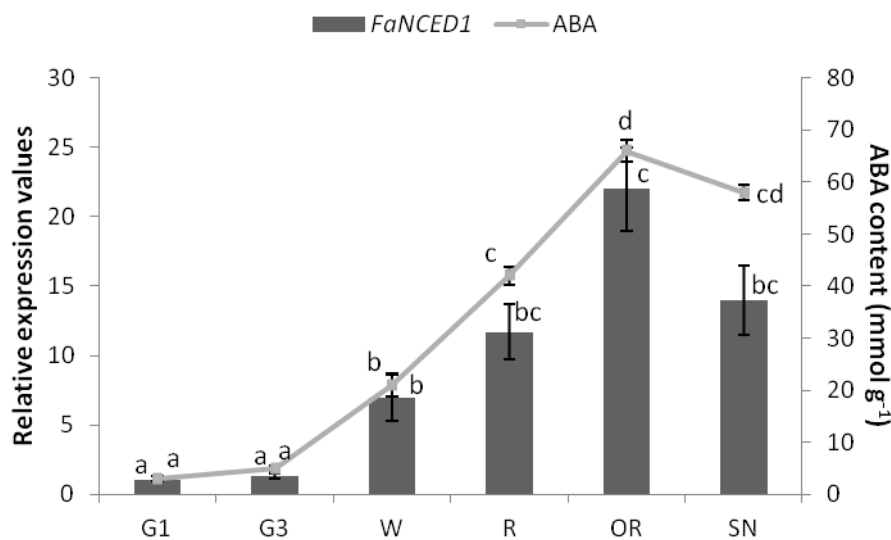
### Determination of ABA as the key regulatory hormone of ripening process in strawberry fruits receptacles.

*The spatio-temporal expression pattern indicates that FaNCED1 is mainly expressed in ripened receptacles and its expression correlates with ABA content along development and ripening of strawberry fruits*

In order to determine the spatio-temporal expression pattern of the *FaNCED1* gene, it was analyzed by semi-quantitative real-time PCR (qRT-PCR), not only the changes in the level of transcript during the development and maturation of the strawberry fruit receptacle, but also in achenes and vegetative tissues. The cultivated *Fragaria* × *ananassa* “Camarosa”, the parentals *Fragaria chiloensis* and *Fragaria virginiana* and wild *Fragaria vesca* varieties were included in this study.

In receptacles, *FaNCED1* was expressed at very low levels during the early G1 and G3 stages of fruit development. A gradual increase in its transcript levels took place starting from W and

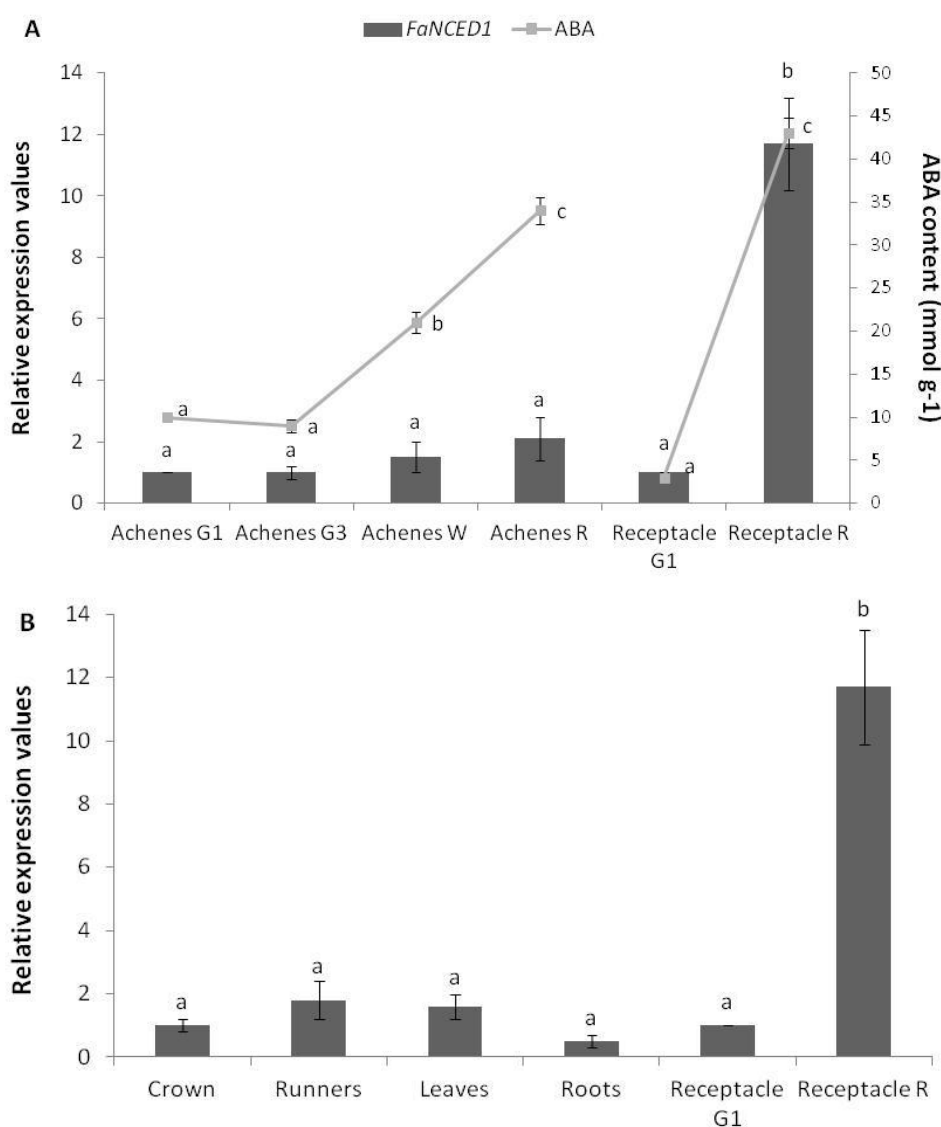
continued to increase during ripening, reaching its maximum expression in OR with a slight decrease in the SN stage. Quantifications of the ABA level were performed by HPLC-MS. During the green stages, the endogenous ABA level was low and increased during the white and red stages and peaked at overripe stage and then declined slightly at senescent stage. Interestingly, the pattern of *FaNCED1* mRNA accumulation was parallel to the ABA changes in strawberry fruits along development and ripening. This behaviour in *FaNCED1* gene expression is consistent with the role of the FaNCED1 enzyme along the ripening process and, specifically, in the production of ABA in strawberry fruits receptacles during development and maturation. These results suggested that ABA biosynthesis in strawberry could be under control of the key enzyme FaNCED1 (Figure 6).



**Figure 6: Developmental expression of strawberry *FaNCED1* gene in receptacles of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” (bars) and ABA content determined by HPLC-MS (line).** Relative expression values (bars) were obtained by quantitative real-time PCR using *FaNCED1* specific primers. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the G1  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Quantification of ABA (line) was obtained by HPLC-MS and values are given in mmol of ABA per g of strawberry (mmol g<sup>-1</sup>). Mean values ± SD of five independent experiments are shown. G1, small-sized green fruit; G3, full-sized green fruit (G1 and G3: stages of development); W, white stage; R, red stage; OR, overripe stage; SN, senescent stage. Statistical significance with respect to the reference sample (receptacle G1) was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , LSD post-hoc test).

In achenes, *FaNCED1* was expressed at very low levels throughout all developmental and ripening stages studied when compared against the expression level obtained in the fruit

receptacle at the G1 and R stages (Figure 7A). However, ABA content in achenes presents similar values than in receptacles, so we might think that there could be a specific *NCED* gene responsible for the biosynthesis of ABA in achenes. Negligible expression levels were observed in all vegetative tissues analysed, such as leaves, crowns, roots and runners (Figure 7B).

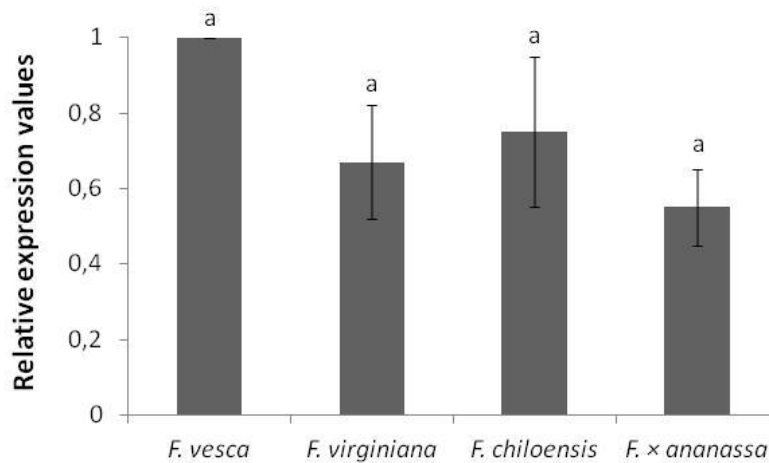


**Figure 7: (A) Developmental expression of strawberry *FaNCED1* gene in achenes and different fruit stages of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” and ABA content quantified by HPLC-MS on achenes and receptacles analyzed. (B) Analysis by quantitative real-time PCR of strawberry *FaNCED1* expression in vegetative tissues and different fruit stages.** Relative expression values (bars) were obtained by quantitative real-time PCR using *FaNCED1* specific primers. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G1  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Quantification of ABA (line) was obtained by HPLC-MS and values are given in mmol of ABA per g of

strawberry ( $\text{mmol g}^{-1}$ ). Mean values  $\pm$  SD of five independent experiments are shown. G1, small-sized green fruit; G3, full-sized green fruit (G1 and G3: stages of development); W, white stage; R, red stage. Statistical significance with respect to the reference sample (receptacle G1) was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , LSD post-hoc test).

Taken together, all these data allowed *FaNCED1* to be defined as a receptacle-specific gene predominantly expressed during the ripening and senescent stages of fruit development.

We performed a comparative expression study of *FaNCED1* transcript levels using ripe fruits of the cultivated variety *Fragaria*  $\times$  *ananassa* “Camarosa”, the parentals *F. virginiana* and *F. chiloensis* and the wild variety *Fragaria vesca*. In all cases, *FaNCED1* gene expression was not significantly different between cultivars, so *FaNCED1* gene expression has not been improved by breeding (Figure 8).

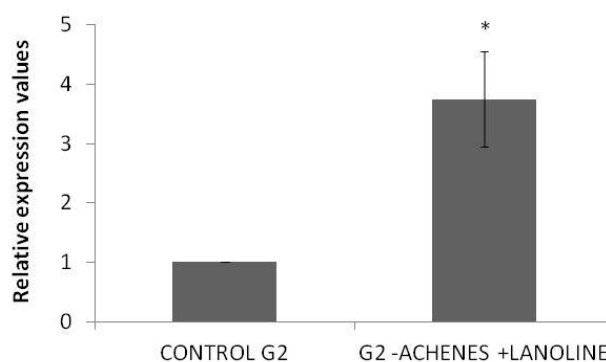


**Figure 8: Analysis by qRT-PCR of *FaNCED1* gene expression in different strawberry species.** Results were obtained using *FaNCED1* specific primers. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the mRNA level found in *F. vesca* variety, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Statistical significance with respect to the reference sample (*F. vesca*) was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , LSD post-hoc test).

#### *FaNCED1* expression in fruit receptacles is repressed by auxin and activated by ABA

ABA/auxin ratio in strawberry fruit receptacles constitutes the signal that triggers the fruit ripening process (Perkins-Veazie, 1995; Jiang and Joyce, 2003). Several studies have shown that the expression of many strawberry ripening related genes is under the negative control of auxins produced by the achenes and released to the fruit receptacle (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998; Blanco-Portales *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2004; Raab *et al.*, 2006; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013, 2015;

Medina-Puche *et al.*, 2014, 2015). In order to study the effect of auxins on *FaNCED1* gene expression, a qRT-PCR gene expression analysis was performed. The comparative gene expression analysis in receptacle of control fruits and deachened green fruits demonstrated an increase of *FaNCED1* gene expression in deachened fruits (Figure 9). This result showed that *FaNCED1* expression is negatively regulated by auxins released from the achenes into the fruit receptacle.

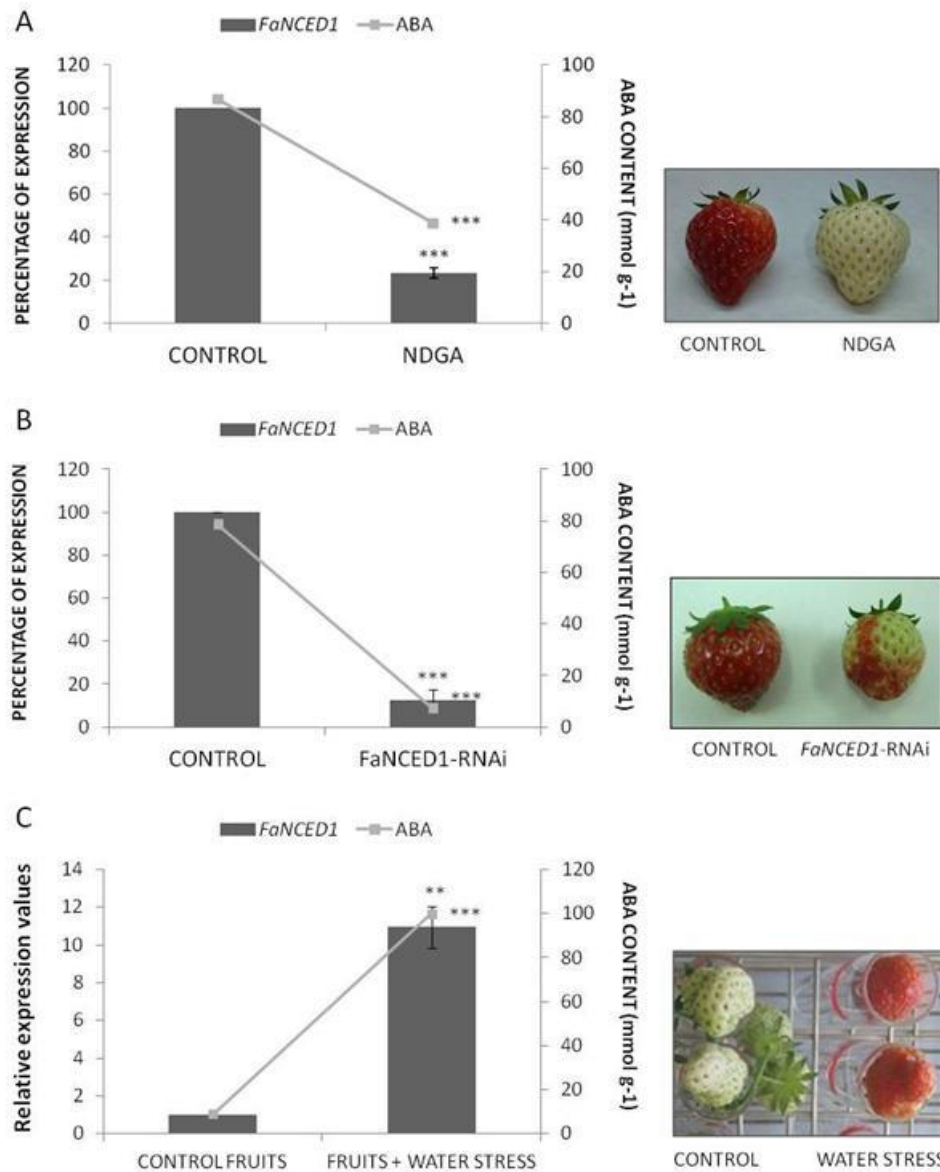


**Figure 9: Analysis of the effects of removing achenes from G2 developing fruits of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” on *FaNCED1* expression by quantitative real-time PCR using specific primers.** Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the receptacle G2  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. G2 CONTROL, middle-sized green fruit receptacle; G2 –ACHENES +LANOLINE, G2 fruit receptacle without achenes for 5 days covered by lanoline paste. Statistical significance with respect to the reference sample (G2 CONTROL) was determined by the Student’s *t*-test: \* $P < 0.05$ .

Recently, some papers reported that the plant hormone ABA may be also involved in the activation of ripening-related genes (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011). To achieve a deeper understanding of the role of the phytohormone ABA in the regulation of *FaNCED1* gene expression, we modulated the receptacle ABA content by three experimental approaches: (A) adding NDGA, an inhibitor of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) activity, the key enzyme responsible for the ABA biosynthesis, (B) by transient silencing of the expression of *FaNCED1* through *in vivo* agroinfiltration with live *Agrobacterium* cells harbouring *FaNCED1*-RNAi constructs and (C) by depleting plants of water, as water stress is known to increase ABA content in the plants (Figure 10). All of these experiments were accompanied by the measurement of ABA content in fruit receptacles. Substantial changes in ABA content in receptacles occurred under the three different experimental procedures described above (Figure 10). In all of these cases, *FaNCED1* expression always correlated with ABA content (Figure



10). These results strongly suggest that ABA presence in the receptacles is correlated positively with the expression of *FaNCED1*.

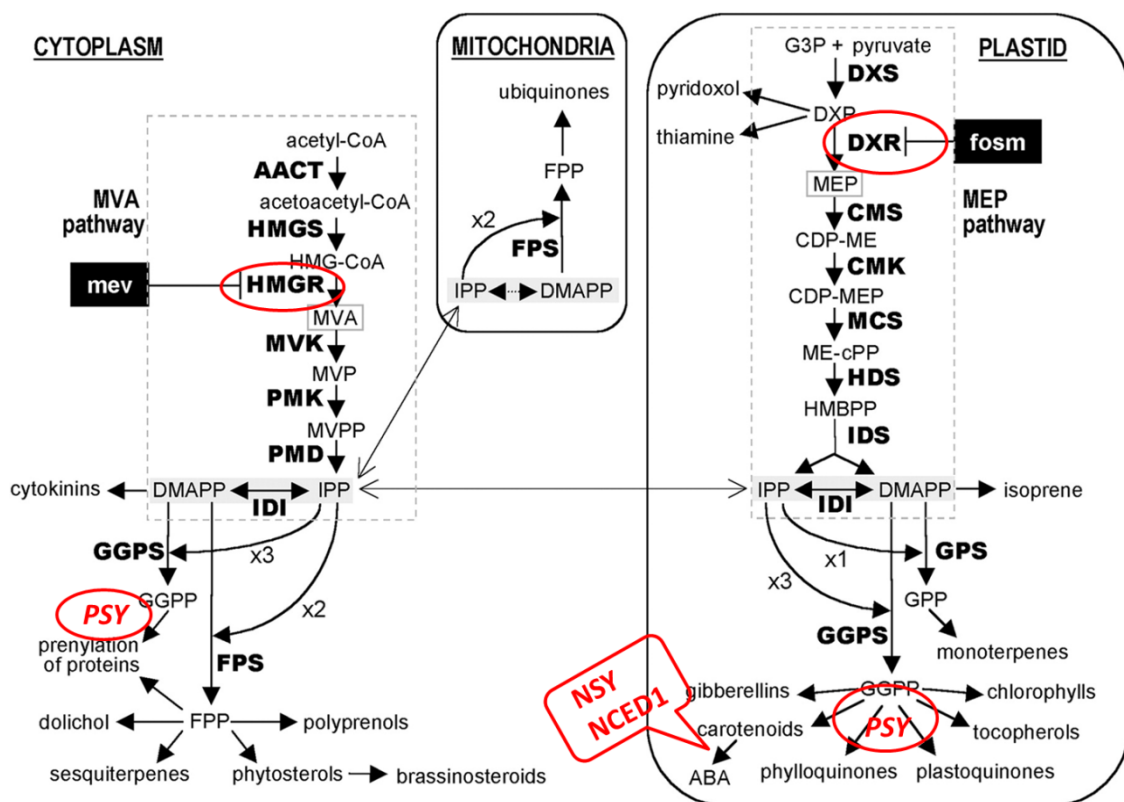


**Figure 10: Analysis by qRT-PCR of *FaNCED1* gene expression (bars) and quantification by HPLC-MS of ABA content (lines).** (A) Control: G-W fruits injected with H<sub>2</sub>O; NDGA: G-W fruits injected with NDGA 100 μM. (B) Control: strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; *FaNCED1*-RNAi: transgenic strawberry fruits agro-infiltrated with the *FaNCED1*-pFRN construct. (C) Control fruit: fruits with the pedicels immersed in MS medium with sucrose; fruits + water stress: fruits with the pedicels kept in the air. Statistical significance with respect to reference sample was determined by the Student's *t*-test in all experiments. (\*\*) *p*-value < 0.01, (\*\*\*) *p*-value < 0.001. On the right side, phenotype of fruits analyzed in each experiment. Color of fruits (anthocyanin content; data non-shown) is correlated positively with *FaNCED1* expression and ABA content.

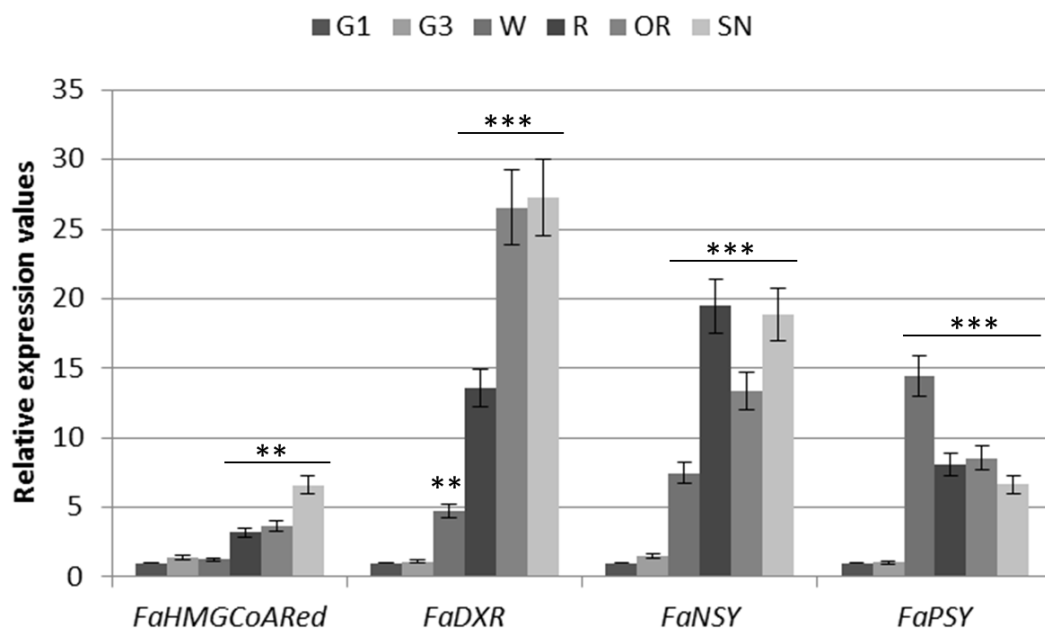
Taken together, these results indicate that *FaNCED1* expression is clearly regulated by both ABA content and auxin content of the fruit receptacle, which provides a putative molecular explanation for both the proposal of Perkins-Veazie (1995) and the findings described by Chai *et al.* (2011) and Jia *et al.* (2011).

### MEP-pathway related-genes expression is positively regulated by ABA

The transcript level of four genes that are related to the MEP-Pathway (Figure 11), and therefore, involved in ABA biosynthesis in strawberry receptacles, was measured at different development and ripening stages by qRT-PCR analysis. In general, the expression patterns for *FaHMGCoARed*, *FaDXR*, *FaNSY* and *FaPSY* showed the typical pattern expression of the ripening-related-genes in strawberry; a quite low expression in the early stages of fruit development (G1 and G3) followed by a significant increase during the ripening process, starting at the white stage (Figure 12). These results suggested that genes belonging to MEP-Pathway are up-regulated along development and ripening process to ensure an increased production of ABA during strawberry fruits maturation.

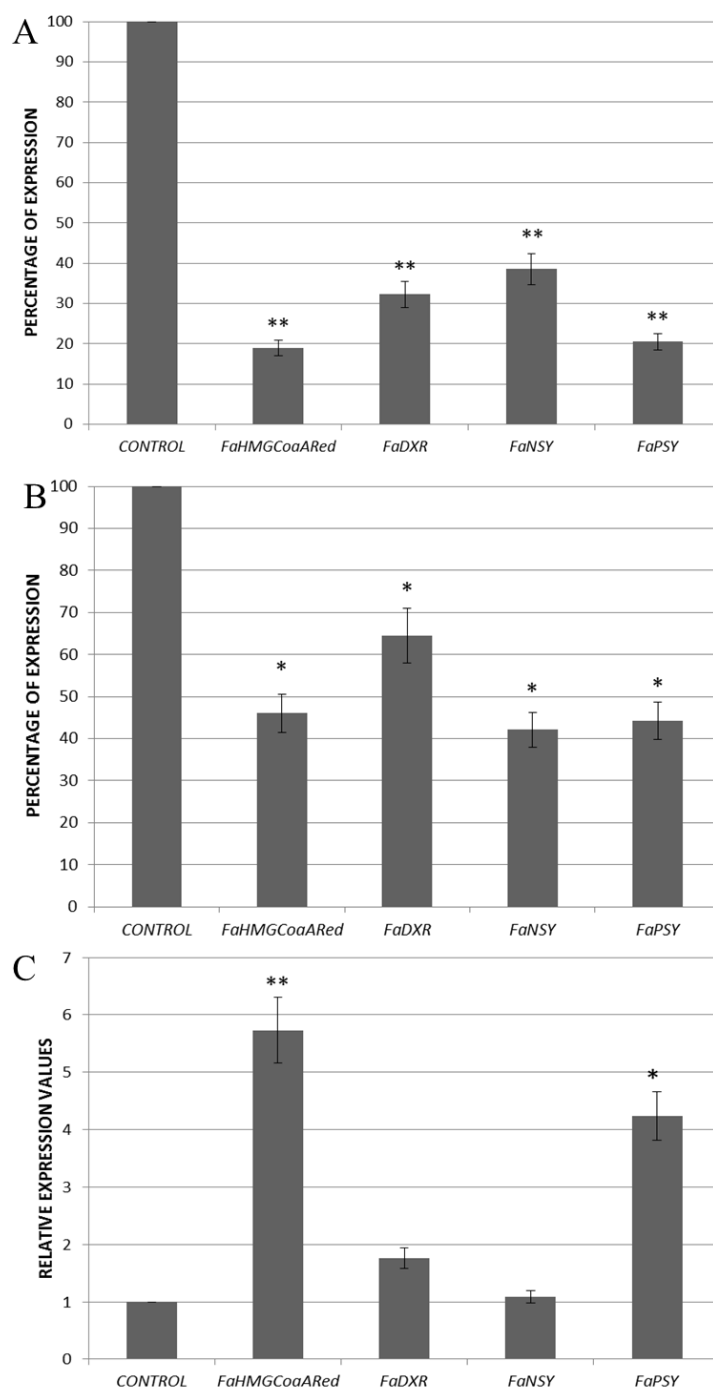


**Figure 11: Schematic diagram of the MVA- and MEP- Pathway.** In red, those genes of interest whose expression was analysed by qRT-PCR.



**Fig.12: Analysis by qRT-PCR of the strawberry MEP-Pathway related genes expression** in developing fruit receptacles of *F. × ananassa* “Camarosa”. Results were obtained using specific primers for each gene. Quantification is based on Ct values as described in Methods. The increase in the mRNA value was relative to the control sample (G1 stage) which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of five independent experiments are shown. Statistical significance with respect to the reference sample was determined by the Student’s *t*-test. (\*\*) *p*-value < 0.01 and (\*\*\*) *p*-value < 0.001.

To assess the role that ABA plays on the regulation of its own biosynthetic pathway, the expression of these MEP-Pathway genes was studied in the fruits mentioned above whose ABA content was modulated (Figure 13). In view of these results, all studied genes of the MEP-Pathway seem to be positively regulated by ABA, so we can say that there is a certain positive feedback regulation by ABA of the expression of these genes.



**Fig.13: Analysis by qRT-PCR of the strawberry MEP-Pathway related genes expression in (A)** Control fruits: G-W fruits injected with H<sub>2</sub>O; Fruits + NDGA: G-W fruits injected with NDGA 100  $\mu$ M, **(B)** Control fruit: strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; NCED1-RNAi fruits: transgenic strawberry fruits agro-infiltrated with the *FaNCED1*-pFRN construct. **(C)** Control fruit: fruits with the pedicels immersed in MS medium with sucrose; fruits + water stress: fruits with the pedicels kept in the air. Results were obtained using specific primers for each gene. Quantification is based on Ct values as described in Methods. The increase in the mRNA value was relative to the control sample in each experiment which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of five independent

experiments are shown. Statistical significance with respect to the reference sample was determined by the Student's *t*-test. (\*) *p*-value < 0.05 and (\*\*) *p*-value < 0.01.

## Discussion

Biochemical and genetic studies have demonstrated that the main regulatory step in ABA biosynthesis in higher plants is the cleavage reaction of *cis*-epoxycarotenoids into xanthoxin catalysed by NCEDs enzymes (Schwartz *et al.*, 2003; Nambara and Marion-Poll, 2005). In the present work a cDNA encoding NCED, named *FaNCED1*, has been isolated from the strawberry fruit receptacle. The predicted FaNCED1 protein shares high sequence identity to other plant NCEDs and contains structural features conserved in all NCEDs (Figure 1). FaNCED1 is most closely related to MhNCED from apple, that belongs to *Rosaceae* family as strawberry, and VvNCED2 and VvNCED1 from *Vitis vinifera*, a non-climacteric fruit as *Fragaria × ananassa*. Besides, sequence alignments analysis showed that FaNCED1 had a high identity percent with CcNCED5 and AtNCED3, which act in response of water stress (Agustí *et al.*, 2007). Expression of *FaNCED1* was also induced by dehydration of receptacles (Figure 10C), and it is likely to be the strawberry orthologue of *CcNCED5* and *AtNCED3*. The recombinant FaNCED1 enzyme catalysed the carotenoid cleavage to yield apocarotenals in the presence of molecular oxygen, ferrous iron, and ascorbate *in vitro*, indicating that FaNCED1 enzyme belongs to the dioxygenase family (Schwartz *et al.*, 1997). Recombinant FaNCED1 protein was previously characterized by their substrate specificity. In maize, the recombinant VP14 protein cleaved 9-*cis* isomers of zeaxanthin, violaxanthin and neoxanthin between the 11 and 12 positions of the polyene chain, indicating that the 9-*cis* configuration is the primary determinant of cleavage specificity for the *in vitro* assays (Schwartz *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2003). In the present study, it was found that *trans* configuration of neoxanthin was not recognized by FaNCED1 and therefore this *trans* isomer was not cut by the recombinant enzyme. However, the *cis* isomer of violaxanthin was identified as a good substrate for the recombinant enzyme FaNCED1 to generate, after the cutting, two products detected by TLC (Figure 4). At least, one of them was identified by LC-MS<sup>n</sup> as C<sub>25</sub> epoxy apo-aldehyde (Figure 5). These results were consistent with previous results from other plant species, such as maize (Schwartz *et al.*, 1997), bean (Qin and Zeevaart, 1999), *Arabidopsis* (Iuchi *et al.*, 2001) and citrus (Kato *et al.*, 2006). Inconclusive results were obtained for the substrate 9-*cis*-zeaxanthin. After the *in vitro* reaction, the substrate disappeared but resulting products were not detected (Figure 4). Although the *cis* configuration is ideal for the recognition of the substrate by the enzyme, perhaps the conditions tested *in vitro* were not the most adequate for optimal enzyme activity. On the other hand, the subcellular localization of NCED has been studied extensively in several plant species. It has been identified a chloroplast signal peptide at the amino terminus,

key in the NCED protein import into the chloroplast (Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001, 2003; Kato *et al.*, 2006), where they perform their function related to ABA biosynthesis during fruit ripening. In strawberry, FaNCED1 presents a putative chloroplast transit peptide at the N-terminus predicted by ChloroP 1.1 algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) (Emanuelsson *et al.*, 1999) and a chloroplastic subcellular localization by TargetP algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000). Thus, there is further evidence of the role that FaNCED1 plays in ABA biosynthesis.

*FaNCED1* was up-regulated in the strawberry receptacles during natural fruit maturation (Figure 6), by reducing the auxin content by removing achenes from the surface of receptacles (Figure 9), and induced in dehydrated fruits (Figure 10C). However, accumulation of the *FaNCED1* transcript was reduced in the receptacle of strawberry fruits by transient silencing of *FaNCED1* gene by RNAi and NDGA treatments (Figure 10A-B). Transient RNAi silencing by agroinfiltration in strawberry fruits is now emerging as a useful tool to study gene functions by reverse transcriptomic approaches (Hoffmann *et al.*, 2006; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). NDGA is a useful way to study ABA function in plants (Creelman *et al.*, 1992) because is an ideal inhibitor of the NCED enzyme thanks to its permeating speed and capability to block ABA biosynthesis (Zhang *et al.*, 2009). In this work, we performed both approaches to study deeply the relationship between *FaNCED1* expression and ABA content in strawberry receptacles. In all cases, *FaNCED1* pattern expression was correlated with ABA content in strawberry fruit receptacles (Figure 6; Figure 10A-B-C). The present study shows that the accumulation of endogenous ABA is well correlated with *FaNCED1* transcript accumulation, suggesting a key role for FaNCED1 in the regulation of ABA synthesis in *Fragaria × ananassa* receptacles. Furthermore, the level of ABA content in strawberry fruit receptacles determined the ripening. This was reflected in the coloration of the fruits after *FaNCED1* gene silencing, blocking the biosynthesis of ABA or water stress response. In all cases, the level of ABA was correlated with the accumulation of anthocyanin in the fruit. The color of the strawberry fruit receptacles due to the accumulation of anthocyanins is a good visual marker to determine the stage of development and maturation. ABA levels promote higher anthocyanin accumulation and fruit ripening. On the other hand, a descent in ABA content results in a decrease in coloring, the fruits remain white and maturation is delayed. These data suggest that ABA indeed promotes the ripening of strawberry fruits. This model is supported by studies of another nonclimateric fruit, such as the grape berry (Giovannoni, 2001; Rodrigo *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006) and recent findings in strawberry (Jia *et al.*, 2011).

In contrast, despite the significant increase in the ABA content in achenes analyzed at different stages along the maturation process, the level of expression of *FaNCED1* detected was very low. In this case, there could be a specific *NCED* gene responsible for the biosynthesis of ABA in achenes. This would be consistent with the fact that NCEDs are encoded by small gene families, whose members exhibit differential expression patterns, such as the well characterized NCEDs from avocado (Chernys and Zeevaart, 2000), *Arabidopsis* (Tan *et al.*, 2003), citrus (Kato *et al.*, 2006), orange (Rodrigo *et al.*, 2006), tomato (Zhang *et al.*, 2009) and grape (Castellarin *et al.*, 2011).

## **CHAPTER 2**

**Transcriptomic studies show that ABA and auxins play a dual role along the strawberry fruit receptacle development and ripening processes**





**CHAPTER 2****Transcriptomic studies show that ABA and auxins play a dual role along the strawberry fruit receptacle developmental and ripening processes****Abstract**

Strawberry is becoming an ideal model of non-climacteric fruit for molecular studies. Hormonal regulation of gene expression along development and ripening of strawberry fruits is still one of the main goals to elucidate. Although auxins and ABA have been pointed out as the major regulators of maturation trigger, few high-throughput analysis have been carried out. One the other hand, a minor role for ethylene and gibberellins as regulatory hormones during the development and ripening of the strawberry fruit receptacles has been proposed.

By using a custom-made oligo microarray platform, we have separated two major groups according its temporal expression within the fruit receptacles into development-related genes and ripening-related genes. First group is up-regulated during the development stages whereas second group is up-regulated during the maturation process. Secondly, each group has been divided into four clusters according to the hormonal regulation of the gene expression. For this purpose different experiments and transcriptome comparisons were carried out. Our results show that auxins and ABA play, combined or independently, principal roles as regulatory hormones of development and ripening process.

Our results clearly support that auxins are the key hormones that regulate receptacle fruit growth and development, and that ABA regulates the expression of the vast majority of genes involved in the ripening. However, auxins- and ABA-independent pathways were observed as well. On the other hand, ethylene and gibberellins seem to not play main roles during this process.

**Introduction**

Fruit developing and ripening is a complex process influenced by numerous factors including light, hormones, temperature, and genotype. Fruits can be classified as climacteric or non climacteric depending upon the presence or not of a burst in respiration taking place at the onset

of ripening, respectively. In climacteric fruits, such as tomato, it is well known the participation of the plant hormone ethylene in the ripening (Giovannoni, 2001; Giovannoni, 2004; Giovannoni, 2007; Klee and Giovannoni, 2011). Grapes and strawberries, however, are two model non-climacteric fruits where the role of ethylene and other plant hormones in ripening remains still uncertain (Chervin *et al.*, 2004; Symons *et al.*, 2006; Symons *et al.*, 2012; Böttcher *et al.*, 2013; Kuhn *et al.*, 2014; Fortes *et al.*, 2015).

Like many other fleshy fruits, the strawberry undergoes four sequential stages during fruit development and ripening. The first phase includes organogenesis that involves fertilization and ovary development (fruit set). The second phase is an active process of cell division accompanied by seed and early embryo formation (Wechter *et al.*, 2008). In the third phase, fruit growth is produced by cell expansion until form large vacuolated cells that make up the flesh of the fruits. Cell expansion includes changes in the cell wall structure and continuous accumulation in vacuoles of carbohydrate, organics acids and different compounds that helps to retain the osmotic pressure and the flow of water into expanding cells (Wechter *et al.*, 2008). The fourth is the ripening phase that takes place after seed maturation and is characterized by a rise in the content of soluble solids in receptacles, a conversion of starch to sugars, the production of natural aroma and flavor compounds, alterations to fruit shape, size, texture and pigmentation and a partial degradation of cell walls that lead to an increased susceptibility to post-harvest pathogens (Wechter *et al.*, 2008). Most of these structural, biochemical and physiological events occurring in the fruit receptacle, are putatively regulated by hormones. The structural, biochemical, and physiological events occurring during the cell expansion and ripening phase contributes to the flavor, texture and overall attractiveness of ripe fruits.

The hormonal control of the ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa*) is starting to be revealed. Ethylene seems to play a minor role since it is detected at low levels (Leshem and Pinchasov, 2000) and no noticeable changes are observed along the ripening when it is added to this fruit (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009). However, it has been proposed that both, ABA and auxins, are heavily involved in the development of this fruit (Perkins-Veazie, 1995, Medina-Puche *et al.*, 2014). Auxins, synthesized by the immature achenes, seems to promote receptacle cell division and expansion and at the same time prevent ripening. So, the removal of achenes in immature fruits or the application of auxins synthesis inhibitors lead to dwarf fruits and to the premature expression of many ripening-related genes (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Trainotti *et al.*, 1999; Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Benitez-Burraco *et al.*, 2003; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Daminato *et al.*, 2013; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2014, 2015). ABA seems to play a major role once the fruits have already developed in size. The endogenous content of ABA increase substantially at the final stages of fruit ripening and this is accompanied by the up-regulation of many ripening

related genes including those involved in anthocyanin production (Chai *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011, Daminato *et al.*, 2013; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). So, the addition of ABA synthesis inhibitors such as NDGA fully block the ripening process, whereas water deprivation, which is known to increase endogenous ABA biosynthesis, promotes premature ripening (Medina-Puche *et al.*, 2014). Though, ABA biosynthesis and signalling seems to play an important role in strawberry fruit ripening, other ABA-independent pathways could also mediate some aspects of the receptacle ripening process (Jia *et al.*, 2013).

Some other plant hormones as ethylene or gibberellins could also play minor roles in the ripening of strawberry. Along the strawberry fruit ripening, only a low endogenous production of ethylene compared with standard climacteric fruits is produced (Perkins-Veazie, 1995; Leshem and Pinchasov, 2000). So, this low concentration of ethylene is present in green fruits, decay in white fruits, and eventually increase at the red stage of ripening (Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Iannetta *et al.*, 2006). The application of ethylene to strawberry fruits does not have, however, a noticeable effect on ripening, though it influence the expression of a subset of ripening-related genes as  $\beta$ -galactosidase, pectin methylesterase, and  $\beta$ -xylosidase (Trainotti *et al.*, 2001; Castillejo *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2009).

The enlargement of receptacle cells during strawberry fruit development is a critical factor determining fruit size with the increase in cell expansion being one of the most important physiological processes regulated by the phytohormone gibberellin (GA). Similarly, a potential role in regulating the strawberry ripening process was proposed for the phytohormone gibberellin (GA) (Csukasi *et al.*, 2011). The endogenous content of three different bioactive gibberellins (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> and GA<sub>4</sub>) was monitored during fruit development and ripening. Of these three phytohormones, the content of GA<sub>4</sub> was extremely high in the receptacle with a maximum in the white stage of ripening (Csukasi *et al.*, 2011). Additionally, in this study, genes with high homology to genes encoding GA pathway components, including receptors [*FaGID1* (*GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1*)*b* and *FaGID1c*], *DELLA* [*FaRGA*(*REPRESSOR OF GA*) and *FaGAI*(*GA-INSENSITIVE*)], and enzymes involved in GA biosynthesis (*FaGA3ox*) and catabolism (*FaGA2ox*), were identified and their expression in different tissues and developmental stages of strawberry fruit were studied. The expression of all of these genes showed a stage-specific pattern during fruit development and was highest in the receptacle, suggesting that GA<sub>4</sub> could be biosynthesized in this tissue (31 Csukasi *et al.*, 2011). However a relationship between GAs and ripening was not demonstrated.

The aim of this study is to clarify the role played by auxins and ABA on the genes responsible for the development and ripening of strawberry receptacles. We have carried out a high-throughput microarray analysis of the transcriptomic changes that takes place in the strawberry fruit receptacle under different hormonal and ripening conditions. Our results clearly support

that auxins are the key hormones that regulate receptacle fruit growth and development, and that ABA regulates the expression of the vast majority of genes involved in the ripening. Auxins- and ABA-independent pathways were observed.

## Results and discussion

The molecular characterization of the genes involved in the development and ripening of strawberry fruit receptacles as well as the knowledge of their hormonal regulation are of biotechnological interest. To investigate this, we have compared transcriptomes using microarrays with RNA isolated under 4 different contrast conditions: A) green immature versus red-ripe receptacles (Additional files; Chapter 2; Additional table 1) ; B) red-ripe receptacles versus those where the endogenous biosynthesis of ABA was inhibited by NDGA (Additional files; Chapter 2; Additional table 2) ; C) green immature versus green de-achened immature receptacles (no data available) and D) red-ripe receptacles versus vegetative tissues (Additional files; Chapter 2; Additional table 4).

After analyzing the data, we ended with 1805 differentially regulated expressed genes ( $\log_2$  fold change  $> 2$  and  $p \leq 0.05$ ) putatively related with the strawberry fruit receptacle development and ripening that could be classified in eight different clusters (Table 1). On those, a total of 1281 and 524 genes were up- and down-regulated in red in comparison green receptacles, respectively (Table 1).

**Table 1: Summary of *Fragaria × ananassa* differentially expressed genes**

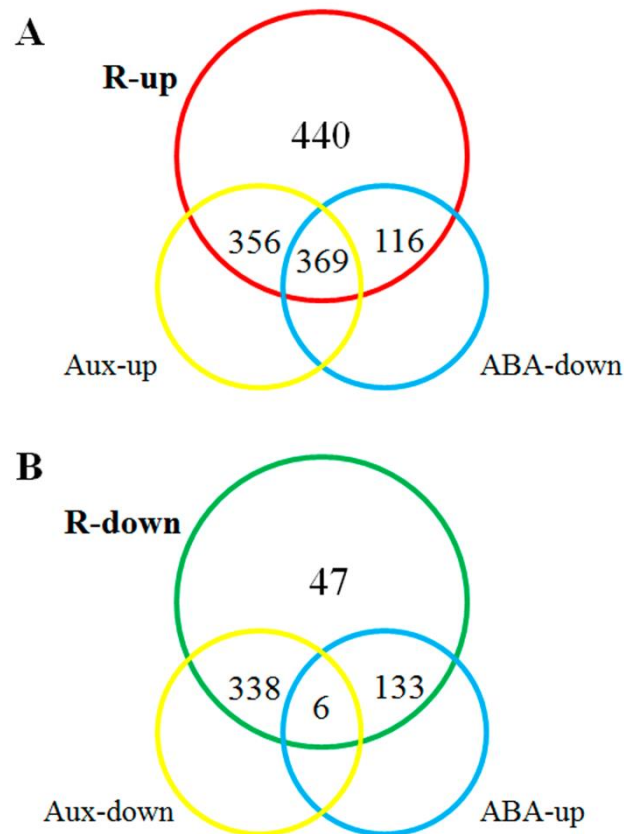
Ripening regulation	Cluster	Number of genes
<b>R-up</b>	1R	369
	2R	116
	3R	356
	4R	440
	<b>Total R-up</b>	<b>1281</b>
<b>R-down</b>	1G	338
	2G	6
	3G	133
	4G	47
	<b>Total R-down</b>	<b>524</b>
<b>Total differentially expressed</b>		<b>1805</b>

The 1281 up-regulated genes were classified and named as follows: **Cluster 1R**, contains 369 genes whose expression were activated by ABA while are repressed by auxins in the fruit receptacle; **Cluster 2R**, contains 116 genes whose expression were activated by ABA, but were not influenced by auxins in the fruit receptacle; **Cluster 3R**, a total of 356 genes whose expression were not affected by ABA, but were repressed by auxins; and **Cluster 4R**, includes 440 ripening related genes whose expression is not influenced neither by ABA nor for auxins (Figure 1A; Table 1).

From Table 1, it can be deduced that approximately a 29% of all of the up-regulated and ripening related genes were activated by both ABA and auxins; a 9% activated only by ABA; 28% activated only by auxins; and approximately a 35% were not affected by any of the two hormones, suggesting that either other hormones (e.g. ethylene or gibberellins) and/or signals (e.g. oxidative stress) could be involved in this process (Martínez *et al.*, 1996; Aharoni *et al.*, 2002; Trainotti *et al.*, 2005; Villareal *et al.*, 2010; Csukasi *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012; Opazo *et al.*, 2013).

The 524 down-regulated genes were classified in the following clusters: **Cluster 1G**, includes 338 genes whose expression were induced by auxins in green G1 fruits; **Cluster 2G**, includes 6 genes whose expression was induced by auxins in the G1 receptacles, but are repressed by ABA in red-ripe receptacles; **Cluster 3G**, includes 133 genes that were induced in G1 receptacles, but were not influenced by auxins but repressed by ABA in fruit ripe receptacles; **Cluster 4G**, includes 47 genes that were up-regulated in G1 receptacles and were not affected by neither ABA nor by auxins (Figure 1B; Table 1).

As in the case of the up-regulated genes, our results show clearly that auxins play a physiological key role at the earliest stages of the process of strawberry receptacle fruit growth. In addition, expression of the vast majority of genes whose expression was up-regulated in young immature receptacles showed a decline of its expression in G1 receptacles where the internal content of auxins diminished after removing the fruit achenes. (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Trainotti *et al.*, 1999; Redondo-Nevado *et al.*, 2001; Benitez-Burraco *et al.*, 2003; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Daminato *et al.*, 2013; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013, 2015; Medina-Puche *et al.*, 2014, 2015). It has been proposed that auxins activate the expression of genes involved in the initial cell proliferation and flesh growth while at the same time is repressing genes related to the receptacle ripening. However, there were also some expression of a significant number of genes were not affected by auxins, what suggests that other hormonal, regulatory or biochemical signals (e.g. brassinosteroids and/or giberellins) could also be involved in the growth.



**Figure 1. Venn Diagram using significantly deregulated genes by ABA and auxins.** Panel A shows ripening-related genes (R-up) regulated by ABA and/or auxins. Panel B shows development-related genes (R-down) regulated by ABA and/or auxins.

### ***Qualitative and quantitative validation of the microarrays data***

Once that differently expressed genes were determined by the microarrays' statistical, we validated these data by real-time PCR (qRT-PCR). For that, several genes for all microarray comparison were selected based on previous bibliographic reports and deregulation levels (Additional files; Chapter 2; Additional table 5). The oligonucleotides sequences are summarized in Additional files; Chapter 2; Additional table 6.

A Pearson's correlation coefficient of 0,868 ( $p$ -value < 0.01) was calculated when we compared the microarray fold changes with those obtained through qRT-PCR. These results indicate that our microarrays are able to detect both low and high fold changes with high accuracy under different experimental conditions. However, fold changes obtained by qRT-PCR were higher than those evaluated by the microarray analysis. These discrepancies are more substantial with those genes with the strongest expression, and could be due to a saturation of the hybridization

in the microarrays (Wurmbach, 2009). Furthermore, qRT-PCR analysis presents a broad range of linearity than microarrays, resulting in more accurate measurements.

### ***Functional annotation and enrichment analysis of the microarray***

Gene annotation with the 1805 differentially expressed genes was done using Blast2Go using BlastX (1.0E<sup>-10</sup> cut-off value). GO terms were assigned to a total of 1335 sequences (aprox. 74%) (Additional files; Chapter 2; Additional tables 7-14), whereas 470 remained non annotated possibly due to either a lack of homologous sequences and/or the presence of non coding RNA in the population of analyzed genes.

Sequence distribution at level 2 is summarized in pie charts in Additional files; Chapter 2; Additional figure 1. We found enrichment for aroma-, flavonols-, biotic stress- and ABA/ethylene hormones-related GO terms in the fruit ripening process (R-up), whereas photosynthetic apparatus- and auxin-related GO terms were enriched gene in the fruit development process (R-down). However, it was detected a similar enrichment in cell wall-related genes between ripening-related and development-related genes (Additional files; Chapter 2; Additional tables 15-28).

### ***More relevant differentially expressed genes***

It is not our intention to discuss in this paper the putative physiological function of all those genes whose expression was differentially expressed throughout the ripening process. We will discuss only the more relevant ones in function of: 1) their putative physiological function; 2) up-regulation of their expression in ripe fruit receptacles; 3) their hormonal regulation by ABA (Cluster 1R and Cluster 2R); 4) their amount of transcript within the red-ripe receptacle transcriptome.

### ***Organoleptic properties-related genes***

In this functional group are included the vast majority of the genes that code proteins that are related with the fruit organoleptic properties and that belong to Cluster 1R. The physiological function of many of them has been previously characterized, as: 1) genes that encode enzymes that are responsible for the biogenesis of aroma in fruit receptacles as alcohol acyltransferases (*gene34009*, *gene23453* and *gene07931*), pyruvate decarboxylase (*gene13476*), or quinone



oxidoreductase (*gene28407*), an enzyme involved in the biosynthesis of furaneol (Table 2; Additional files, Chapter 2, Additional table 15); 2) genes that encode cell wall hydrolases as pectate lyase B (*gene17555*), polygalacturonases (*gene21638* and *gene19241*), endo-beta-1,4-glucanases (FaEG1) (*gene34867* and *gene06191*), rhamnogalacturonate lyase (*gene31030*) as well as an expansin (*gene21343*). These genes contribute, through cell wall degradation processes, to fruit softening along the ripening process (Table 3; Additional files, Chapter 2, Additional table 16), 3) or genes encoding enzymes of the flavonoids/phenylpropanoids metabolic pathway including several glucosyl transferases (*gene26265*, *gene20181*, *gene26249*, *gene24225*, *gene26352* and *gene12591*), a UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase (*gene14947*), a phenylalanine ammonia lyase (*gene23261*), a flavonol 3 hydroxylase (FaFHT) (*gene14611*), a flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FaUFGT) (*gene12591*), a cinnamoyl CoA reductase (FaCCR) (*gene32333*), a cinnamyl alcohol dehydrogenase (FaCAD1) (*gene20700*), and a isoflavone reductase (eugenol synthase 2; FaEGS2) (*gene25260*) (Table 4; Additional files, Chapter 2, Additional table 17).

In addition, we have found in this expression group novel genes, still not functionally characterized, that encode enzymes potentially related to the biosynthesis of aromas, such as alcohol acyltransferases (*gene27724*, *gene22294*, *gene34010* and *gene19765*), alcohol dehydrogenases (*gene06565*, *gene32435* and *gene01341*) (Table 2; Additional files, Chapter 2, Additional table 15) and that putatively encode proteins or enzymes involved in cell wall degradation or modification, such as, one  $\alpha$ -expansins (*gene28118*), two xyloglucan:xyloglucosyltransferase (*gene26403* and *gene13718*), a mannan endo-1,4-beta-mannosidase (*gene15177*), a beta-1,4-mannosyl-glycoprotein (*gene31094*), a pectin methylesterase (*gene05463*), and a potential polygalacturonase (*gene16186*) (Table 3; Additional files, Chapter 2, Additional table 16). Also included in Cluster 1R, we have indentified new genes probably related to the flavonoid/phenylpropanoid metabolism. These genes code two anthranilate synthases (*gene20939* and *gene04128*), a 4-coumarate CoA ligase (*gene09603*), a chalcone flavonone isomerase (CHI) (*gene21346*), two novel cinnamoyl CoA reductases (CCR) (*gene29482* and *gene29483*), a cinnamoyl-CoA hydratase-dehydrogenase (CHD) (*gene30926*), a cinnamyl alcohol dehydrogenase (*gene08569*), a malonyl-CoA:isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase (*gene04262*), and two glucosyltransferases (*gene25577* and *gene26353*) (Table 4; Additional files, Chapter 2, Additional table 17). The physiological function of these genes has yet to be clarified.

On the other hand, in Cluster 2R, our studies have revealed the up-regulation of a gene coding for a cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (*gene24967*), enzyme that potentially participates in vasculature lignifications process and also in eugenol biosynthesis (Aharoni *et al.*, 2002;

Blanco-Portales *et al.*, 2002), and two isoflavone reductases (IFR) (*gene25258* and *gene25257*) (Table 4; Additional files, Chapter 2, Additional table 17). IFR participates in the last steps of the biosynthetic pathway of isoflavonoids and is related to the regulation of lignin changes (Hua *et al.*, 2013). Additionally, the expression of *gene04127* (*hydroxyproline-rich glycoprotein*) and *gene16326* (*xyloglucan galactosyltransferase*) that belong to Cluster 2R, was also up-regulated (Table 3; Additional files, Chapter 2, Additional table 16). These genes encode cell wall proteins that act in diverse aspects of plants growth and development (Showalter *et al.*, 2010) and have important roles in the formation and function of the walls that surround growing plant cells (Kong *et al.*, 2015).

### *Fatty acids-derived and other lipophilic flavor compounds*

Specifically, flavors ester production relies upon the supply of alcohols and acyl-CoA formed during  $\beta$ -oxidation. In plants, the majority of volatiles on a quantitative and qualitative basis originate from the degradation of saturated and unsaturated straight-chain fatty acids by  $\alpha$ - and  $\beta$ -oxidation processes (Schwab *et al.*, 2008). Additionally, de novo synthesis and hydrolysis of fatty acids from acyl carrier proteins (acyl ACP) can also provide volatile acids (Schwab *et al.*, 2008). In fruits, alcohols can also be formed by hydrogenation of aldehydes through the action of flavor-related alcohol dehydrogenases (ADHs) (Manriquez *et al.*, 2006). Several genes that can putatively encode genes of the fatty acid metabolim that can be potentially related with aroma production in ripe strawberry fruits are included into Cluster 1R. In this cluster, the vast majority of aroma-related genes are also included. The expression of many of these genes was fruit specific and also highly expressed within the transcriptome of red-ripe receptacle. Among them, we can found a stearyl ACP desaturase (*gene21537*), an acyl carrier protein (*gene16428*), two different Acyl-CoA thioesterases (*gene03716* and *gene03720*), a malonyl-CoA decarboxylase (*gene19498*) and several different acyltransferases (*gene14837*, *gene14839*, *gene15086*, and *gene19766*) (Table 5; Additional files, Chapter 2, Additional table 18). Their expression profiles match with the expression profiles of the strawberry alcohol acyltransferases involved in the process of volatile ester formation in strawberry (Aharoni *et al.*, 2000; Cumplido-Laso *et al.*, 2012).

Table 2. Manual annotation of differentially regulated aromas-related genes sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

AROMA-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene27724	alcohol acyl transferase	4,106	7,74E-04	611,736	<i>Pyrus communis</i>	7E-34	AY534530	
gene22294	alcohol acyl transferase	12,668	7,74E-04	1822,214	<i>Malus x domestica</i>	9E-177	AY517491	
gene34010	alcohol acyl transferase	80,556	4,18E-04	13706,894	<i>Fragaria vesca</i>	0.0	AF193790	
gene34009	alcohol acyl transferase	112,727	4,94E-04	262737,325	<i>Fragaria x ananassa</i>	1E-25	AF193789	Aharoni, A. 2000
gene23453	alcohol acyl transferase	83,547	3,88E-04	41393,53	<i>Fragaria chiloensis</i>	3E-52	FJ548610	González, M. 2009
gene07931	alcohol acyl transferase	30,671	3,84E-04	79123,951	<i>Fragaria x ananassa</i>	5E-98	JN089766	Cumplido-Laso, G. 2012
gene01341	alcohol dehydrogenase	9,465	1,29E-03	102324,416	<i>Prunus armeniaca</i>	6E-142	EU395433	
gene19765	long-chain-alcohol O-fatty-acyltransferase	34,804	4,58E-04	40077,082	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-67	NM_124916	
gene13476	pyruvate decarboxylase	3,044	8,06E-04	21108,132	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AF193791	Aharoni, A. 2000
gene28407	quinone oxidoreductase	99,228	6,91E-04	71563,74	<i>Fragaria x ananassa</i>	7E-102	AY048861	Raab, T. 2006
gene06565	short chain dehydrogenase	3,613	1,14E-03	29043,423	<i>Solanum tuberosum</i>	3E-87	AB192882	
gene32435	short chain dehydrogenase/reductase	36,45	4,01E-04	29440,949	<i>Nandina domestica</i>	3E-98	FJ789568	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene03054	alcohol dehydrogenase	4,444	1,14E-03	34817,814	<i>Prunus dulcis x Prunus persica</i>	0.0	HM240512	
gene15359	ketone/zingerone synthase	2,565	7,05E-04	3645,113	<i>Rubus idaeus</i>	0	JN166691	

Table 3. Manual annotation of differentially regulated cell wall-related genes sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

CELL WALL-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene26030	alpha-expansin 3	7,218	5,49E-04	1135,409	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	3E-125	AY435101	
gene14343	annexin	14,816	4,16E-04	31932,04	<i>Fragaria x ananassa</i>	9E-180	AF188832	Wang, GL. 2001
gene31094	beta-1,4-mannosyl-glycoprotein	22,037	6,42E-04	5872,412	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-71	NM_101170	
gene34867	endo-beta-1,4-glucanase	444,724	3,82E-04	117102,147	<i>Fragaria x ananassa</i>	4E-45	AJ414709	Spolaore, S. 2003
gene06191	endo-1,4-beta-glucanase	12,972	4,47E-04	101516,363	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AF074923	Harpster, MH. 1998
gene28118	expansin	2,541	2,96E-03	5686,578	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	2E-135	AB370116	
gene21343	expansin 2	3,514	7,05E-04	27077,312	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AF159563	Civello, PM. 1999
gene06193	invertase/pectin methylesterase inhibitor	7,621	1,44E-03	1576,893	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	6E-76	XP_009351520	
gene15177	mannan endo-1,4-beta-mannosidase	4,934	6,80E-04	44606,809	<i>Prunus persica</i>	0.0	EF568778	
gene17555	pectate lyase B (FaPLB)	4,059	1,11E-03	79298,451	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AF339024	Benítez-Burraco, A. 2003
gene05463	pectin methylesterase	5,545	8,30E-04	27998,146	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	U25649	
gene16186	polygalacturonase	5,382	1,07E-03	752,122	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002274102	
gene21638	polygalacturonase 1 (FaPG1)	14,459	4,09E-04	1905,208	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	DQ458990	Quesada, MA. 2009
gene19241	polygalacturonase 2 (FaPG2)	3,205	1,45E-03	15925,282	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY280662	Salentijn, EMJ. 2003
gene31030	rhamnogalacturonate lyase (FaRGlyase)	25,988	9,80E-04	1799,52	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY282613	Molina-Hidalgo, FJ. 2013
gene26403	xyloglucan glycosyltransferase	4,841	1,93E-03	2613,867	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003543785	
gene13718	xyloglucan:xyloglucosyl transferase	10,015	3,89E-04	14733,559	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-132	NM_102950	

(table continues on following page)

CELL WALL-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated							
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference	
<b>CLUSTER 2</b>									
gene04127	hydroxyproline-rich glycoprotein	2,847	9,78E-04	8638,53	<i>Populus trichocarpa</i>	9E-141	XM_002311511		
gene16326	Xyloglucan galactosyltransferase KATAMARI1	6,428	2,37E-03	1835,538	<i>Medicago truncatula</i>	1E-78	XM_003617783		
<b>CLUSTER 3</b>									
gene05164	beta xylosidase	4,05	6,44E-04	7362,412	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY486104	Martinez, G.A. 2004	
gene04618	beta-1,3-glucanase	5,65	2,51E-04	1114,343	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY170375	Khan, A.A. 2003	
gene03446	beta-1,3-glucanase	25,36	3,81E-04	24180,842	<i>Ziziphus jujuba</i>	0.0	DQ093571		
gene22434	pectinesterase	5,32	1,64E-03	1499,436	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-161	NM_115763		
gene10629	pectinesterase	3,89	3,07E-03	1948,185	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_116466		
gene00522	polygalacturonase-inhibiting protein	13,34	4,10E-04	1114,74	<i>Rubus idaeus</i>	0.0	CAF04462		
gene11447	proline-rich cell wall protein	8,58	6,94E-04	30581,594	<i>Vitis vinifera</i>	3E-04	AJ237982		
gene31031	rhamnogalacturonate lyase protein	54,25	5,73E-04	1094,262	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_127827		
gene12291	xyloglucan endotransglycosylase	6,00	6,12E-04	1574,01	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	2E-165	AGR44475		
gene00663	xyloglucan endotransglycosylase hydrolase	3,78	8,07E-04	944,695	<i>Apium graveolens</i>	3E-35	DQ204724		
<b>CLUSTER 4</b>									
gene01893	alpha/beta-hydrolase domain-containing protein	8,462	1,44E-04	21532,142	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_105142		
gene05671	beta-1,3-glucanase	13,436	5,73E-04	1038,505	<i>Vitis riparia</i>	4E-118	EU676805		
gene12025	Exopolygalacturonase	2,772	4,61E-03	2530,228	<i>Populus trichocarpa</i>	9E-116	XM_002301453		

Table 4. Manual annotation of differentially regulated flavonols/phenylpropanoid metabolism-related genes sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

FLAVONOLS/PHENYLPROPANOID METABOLISM-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene09603	4-coumarate-coa ligase	16,273	4,86E-04	71314,032	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_116755	
gene20939	anthranilate synthase alpha subunit	16,707	4,22E-04	2198,718	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	M92353	
gene04128	anthranilate synthase beta subunit	17,342	3,87E-04	13939,922	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-122	XM_002314725	
gene21346	chalcone flavonone isomerase (CHI)	2,86	1,03E-03	219991,684	<i>Prunus persica</i>	9E-116	HM543569	
gene32333	cinnamoyl CoA reductase (CCR)	5,86	6,19E-04	4490,154	<i>Fragaria x ananassa</i>	3E-106	AY285922	Salentijn, EMJ. 2003
gene29482	cinnamoyl CoA reductase	13,863	4,57E-04	5311,66	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-132	XM_002314017	
gene29483	cinnamoyl CoA reductase	14,761	5,35E-04	6119,27	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-158	XM_002314016	
gene30926	cinnamoyl-CoA hydratase-dehydrogenase (CHD)	4,256	1,42E-03	40490,529	<i>Petunia x hybrida</i>	0.0	JX142126	
gene20700	cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)	348,576	3,79E-04	152638,488	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	U63534	Blanco-Portales, R. 2002
gene08569	cinnamyl alcohol dehydrogenase	35,373	3,90E-04	15980,983	<i>Camellia sinensis</i>	4E-176	GQ438848	
gene14611	flavanone 3-hydroxylase (FHT)	2,697	1,25E-03	255100,62	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY691918	Almeida, JR. 2007
gene12591	flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FaUGT)	190,971	8,27E-04	34629,998	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY695815	Almeida, JR. 2007
gene07065	Fra a 2 allergen (Fraa2)	7,103	1,02E-03	84071,637	<i>Fragaria x ananassa</i>	1E-102	GQ148818	Muñoz, C. 2010
gene25577	glucosyltransferase	3,886	5,82E-04	755,83	<i>Vitis vinifera</i>	3E-27	JN164680	
gene25260	isoflavone reductase (eugenol synthase 2; FaEGS2)	945,604	1,14E-03	10732,21	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AGV02008.1	

(table continues on following page)

FLAVONOLS/PHENYLPROPANOID METABOLISM-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated							
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference	
<b>CLUSTER 1</b>									
gene04262	malonyl-CoA:isoflavone 7-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase	16,965	1,03E-03	1048,548	<i>Glycine max</i>	2E-92	NM_001249890		
gene23261	phenylalanine ammonia lyase (PAL)	3,042	1,71E-03	57410,815	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	HM641823	Pombo, MA. 2011	
gene26353	phenylpropanoid:glucosyltransferase	5,679	5,08E-04	15288,679	<i>Nicotiana tabacum</i>	1E-163	AF346431		
gene18829	polyphenol oxidase 2 (PPO2)	14,979	4,93E-04	2805,2	<i>Fragaria pentaphylla</i>	0.0	HM063946		
gene26265	UDP-glucose glucosyltransferase	11,401	4,08E-04	99900,157	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY663785	Lunkenbein, S. 2006	
gene20181	UDP-glucose glucosyltransferase	31,879	3,72E-04	1602,396	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY663786	Lunkenbein, S. 2006	
gene26249	UDP-glucose glucosyltransferase	2,408	3,06E-03	2467,037	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	DQ289586	Griesser, M. 2008	
gene24225	UDP-glucose glucosyltransferase	41,256	4,01E-04	6709,78	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	DQ289587	Griesser, M. 2008	
gene26352	UDP-glucose glucosyltransferase	2,561	1,46E-03	844,524	<i>Fragaria x ananassa</i>	3E-165	DQ289588	Griesser, M. 2008	
gene12591	UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase	240,118	3,80E-04	25063,16	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY663784	Lunkenbein, S. 2006	
gene14947	UDP-rhamnose:rhamnosyltransferase	21,319	3,77E-04	3726,085	<i>Fragaria x ananassa</i>	2E-179	AY663787	Lunkenbein, S. 2006	
<b>CLUSTER 2</b>									
gene28093	cinnamate-4-hydroxylase	5,436	2,56E-04	15892,832	<i>Rubus occidentalis</i>	0.0	FJ554629		
gene24967	cinnamyl alcohol dehydrogenase	2,271	1,36E-03	11025,849	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	0	HQ268590		
gene25258	isoflavone reductase	5,539	5,25E-04	17012,885	<i>Glycine max</i>	1E-170	AF202184		
gene25257	isoflavone reductase	8,14	9,10E-04	2265,382	<i>Pyrus communis</i>	4E-109	AF071477		
<b>CLUSTER 3</b>									
gene15845	cinnamoyl CoA reductase	5,45	1,22E-03	40597,858	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY285922	Salentijn, E.M.J. 2003	
gene03747	cinnamoyl-CoA reductase	13,45	4,06E-04	823,034	<i>Jatropha curcas</i>	5E-162	GQ149700		
gene30778	flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	3,058	2,52E-03	4135,94	<i>Medicago truncatula</i>	4E-126	XM_003609420		
gene16550	hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase	12,37	4,73E-04	866,869	<i>Vitis vinifera</i>	3E-120	XP_002273086		

(table continues on following page)

FLAVONOLS/PHENYLPROPANOID METABOLISM-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated							
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference	
<b>CLUSTER 3</b>									
gene17831	isoflavone 3'-hydroxylase	52,37	3,80E-04	2126,824	<i>Medicago truncatula</i>	1E-108	AY278228		
gene04258	Isoflavone 7-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase	8,62	6,39E-04	2844,052	<i>Glycine max</i>	3E-73	AB291059		
gene09318	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase	2,348	1,47E-03	759,62	<i>Medicago truncatula</i>	2E-117	XM_003607060		
gene26345	phenylpropanoid :glucosyltransferase	2,406	1,80E-03	714,89	<i>Nicotiana tabacum</i>	2E-177	AF346431		
gene30434	polyphenol oxidase	59,21	9,86E-04	2318,431	<i>Potentilla fruticosa</i>	0.0	DQ851214		
gene00494	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase	20,49	1,19E-03	2041,434	<i>Vitis vinifera</i>	6E-98	XP_002277375		
gene26344	UDP-glucose glucosyltransferase	2,821	1,75E-03	881,11	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	DQ289588	Griesser, M. 2008	
gene24224	UDP-glucose glucosyltransferase	451,72	4,86E-04	2664,134	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY663786	Lunkenbein, S. 2006	
gene06602	UDP-glucose:flavonoid 7-O-glucosyltransferase	3,86	7,39E-04	9323,865	<i>Malus x domestica</i>	0.0	AY786997		
<b>CLUSTER 4</b>									
gene03689	isoflavone reductase homolog	2,569	1,11E-03	963,847	<i>Glycine max</i>	3E-165	XM_003533408		
gene27021	UDP-glucuronosyltransferase	2,154	1,16E-03	1690,034	<i>Ricinus communis</i>	8E-174	XM_002530352		
gene01708	UDP-glycosyltransferase	2,153	8,39E-04	2188,141	<i>Vitis vinifera</i>	0	XM_002267629		



Table 5. Manual annotation of differentially regulated lipid metabolism-related genes sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

LIPID METABOLISM-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated							
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference	
<b>CLUSTER 1</b>									
gene15086	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	14,735	7,70E-04	1533,064	<i>Lotus japonicus</i>	0.0	AP004969		
gene16428	acyl carrier protein	9,246	3,89E-04	250709,656	<i>Fragaria vesca</i>	1E-94	AJ001446		
gene32451	acyl:coa ligase	4,454	7,71E-04	12468,596	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002322437		
gene19766	acyl-CoA--sterol O-acyltransferase	27,514	5,11E-04	35119,281	<i>Glycine max</i>	2E-99	XM_003534777		
gene18789	alpha-carboxyltransferase	8,458	8,70E-04	4229,298	<i>Jatropha curcas</i>	0.0	GQ845013		
gene10626	epoxide hydrolase	6,538	5,23E-04	4240,341	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-155	NM_116467		
gene14921	epoxide hydrolase	6,244	5,25E-04	1359,326	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-78	NM_114960		
gene22011	GDSL esterase/lipase	12,902	9,78E-04	2357,557	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8E-103	NM_102626		
gene19498	malonyl-CoA decarboxylase family protein	6,193	7,85E-04	7642,606	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	2E-162	XM_002872641		
gene30534	non-specific lipid-transfer protein 2	48,826	4,45E-04	16848,37	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	1E-25	XP_009357786		
gene14839	O-acyltransferase WSD1	621,993	4,33E-04	1423,823	<i>Vitis vinifera</i>	3E-79	XM_002274486		
gene14837	O-acyltransferase WSD1	106,07	2,79E-02	951,027	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-37	XM_002328929		
gene30403	sphingolipid delta-4 desaturase	2,825	1,05E-03	4293,257	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_116731		
gene21537	stearoyl-ACP desaturase	9,78	6,32E-04	21938,505	<i>Vernicia montana</i>	0.0	EU072353		
gene03720	thioesterase	53,345	5,48E-04	1117,897	<i>Vitis vinifera</i>	3E-88	AM447422		
gene03716	thioesterase	65,231	3,84E-04	1332,166	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-64	NM_105497		

(table continues on following page)

LIPID METABOLISM-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 2</b>								
gene12921	beta-ketoacyl-ACP synthase	2,01	4,06E-02	715,004	<i>Arachis hypogaea</i>	0.0	EU823327	
gene31042	phospholipase D	36,321	4,08E-04	2984,85	<i>Cucumis sativus</i>	0.0	EF363796	
<b>CLUSTER 3</b>								
gene25083	12-oxophytodienoate reductase	3,111	7,21E-04	2484,61	<i>Theobroma cacao</i>	3E-89	EOY17386	
gene25061	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	2,028	2,11E-03	10889,97	<i>Glycine max</i>	3E-125	XM_003518929	
gene16355	acyl-coenzyme A oxidase	8,64	4,96E-04	1933,611	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_125910.5	
gene08561	GDSL esterase/lipase	10,38	5,26E-04	1459,027	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6E-118	NM_202420	
gene05435	GDSL esterase/lipase	4,28	2,06E-03	3628,274	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8E-103	NM_104270	
gene05818	long chain acyl-CoA synthetase	5,24	1,32E-03	2526,885	<i>Vitis vinifera</i>		XP_002277936	
gene08996	monoglyceride lipase	4,59	6,39E-04	10229,516	<i>Cicer arietinum</i>	0.0	XP_004501143	
gene13454	omega-3 desaturase	11,66	4,57E-04	3907,154	<i>Prunus persica</i>	0.0	AF517831	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene06158	acyl carrier protein	4,019	4,62E-03	5411,52	<i>Arachis hypogaea</i>	5E-32	FJ768733	
gene00708	acyl-CoA dehydrogenase	5,119	1,67E-03	704,991	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002314327	
gene06841	fatty acid beta-oxidation multifunctional protein	2,002	5,01E-04	1749,846	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_111566	
gene13295	phospholipase A2 homolog	2,334	2,90E-03	3023,973	<i>Cucumis sativus</i>	5E-41	XM_004157866	
gene15770	phospholipase d zeta	2,334	9,57E-04	1189,399	<i>Ricinus communis</i>	0.0	XM_002516928	
gene11707	prostaglandin E synthase	2,319	1,41E-03	3941,997	<i>Medicago truncatula</i>	1E-135	XM_003619775	

Signalling and Regulatory proteins

Fleshy fruit development and ripening is a high complex process that include the coordination of many metabolic pathways involved in color, taste, firmness, flavor, turgor in order to produce a normal ripe fruit. All these process underlying fruit receptacle development and ripening must be carefully regulated. In this sense our microarray analysis has identified several transcription factors (TFs) and regulatory proteins whose expression pattern allowed its inclusion into each ripening-related cluster.

*Up regulated TFs*

The microarray expression studies showed that 16 genes coding transcription factors belong to Cluster 1R and 10 genes belong to Cluster 2R. Out of them, six TFs present a high amount of transcripts within the transcriptome of red ripe receptacles. (Table 6; Additional files, Chapter 2, Additional table 19). Between them, *gene31413*, *gene28435*, *gene09407* and *gene24494*, coding three R2R3 MYB TFs and a MADS-box TF (*FaSHP*; SHATTERPROOF-like gene) respectively, have been functionally characterized. *FaMYB10* (*gene 31413*) has been described as a ripening-related master regulatory gene of the structural flavonoid/phenylpropanoid metabolic pathway genes (Medina-Puche *et al.*, 2014) whereas *FaEOBII* (*gene28435*) is a positive regulator of two concrete flavonoids/phenylpropanoids volatile-related genes, *FaCAD1* and *FaEGS2*, controlling eugenol production in ripe strawberry receptacles (Medina-Puche *et al.*, 2015). *FcMYB1* (*gene09407*) was functionally characterized as regulator of the branching point of the anthocyanins/proanthocyanidins biosynthesis (Salvatierra *et al.*, 2013). *FaSHP* (*gene24494*) codes a C-type MADS-box gene. Transient down regulation of this *FaSHP* gene in strawberry receptacle caused a slightly shorter delay in the time required to reach the pink stage of ripening (Daminato *et al.*, 2013). Besides, expression of several ripening related genes as well as the content of different metabolites was altered in the transiently modified fruits (Daminato *et al.*, 2013). A secondary role as modulador of ripening was proposed for this *FaSHP* gene (Daminato *et al.*, 2013). Recently, the role played in by *FaSCL8* along strawberry fruit ripening was proposed (Pillet *et al.*, 2015). It has been indicated that this TF could modulate the regulation of the expression of those genes related to the flavonoid/anthocyanin biosynthesis probably through their influence on *FaMYB10* gene expression (Pillet *et al.*, 2015).

Additionally, we have identified three different WRKY (*gene28720*, *gene19478* and *gene01340*), two AP2/ERF (*gene07057* and *gene32084*), two R2R3 MYB (*gene25060* and *gene19715*), two basic helix-loop-helix (bHLH) (*gene30478* and *gene23830*), a NAC (*gene29766*), a DOF (*gene32526*), a CH2H2L zinc finger (*gene25547*), a ZF-HD (*gene26009*)

and a SCL (*gene13212*) transcription factors that belong to Cluster 1R and 2R. Out of them, the expression of *FaMYB10* (*gene31413*), *FaSHP* (*gene24494*), *WRKY* (*gene28720*), *R2R3 MYB* (*gene25060*), *AP2/ERF* (*gene32084*), *SCL* (*gene13212*), *DOF* (*gene32526*) and *NAC* (*gene29766*) was strongly high in fruit receptacles respect to vegetative tissues (Table 6; Additional files, Chapter 2, Additional table 19). These results clearly suggest that these TFs regulate the expression of those genes involved in receptacle fruit ripening, as previously demonstrated for *FaMYB10*, *FaSHP*, *FaEOBII* or *FaSCL8* (Daminato *et al.*, 2013; Medina-Puche, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015; Pillet *et al.*, 2015).

### *Other regulatory proteins*

In Cluster 1R were also included two genes that putatively encode two small proteins containing a C2 domain (*gene19112* and *gene26051*), as well as a gene corresponding to a multiple C2 and transmembrane domain-containing protein (*gene32454*) (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). The C2 domains are found in a large variety of proteins, where the C2 module could be combined with a wide range of other modules encoding different enzymatic activities involved in intracellular signal transduction and membrane trafficking (Zhang and Aravind, 2010). Recently, it has been demonstrated that a family of small proteins containing a lipid binding C2 domain (CAR proteins) can interact with the ABA-receptor PYR/PYLs and positively regulate ABA sensitivity (Rodríguez *et al.*, 2014). Of these genes coding C2 domain-containing proteins, only the expression of *gene19112* was fruit receptacle specific. Besides, *gene19112* code a small protein that contains a C2 domain located into the N-terminal end of the protein, indicating that this C2-protein could be a CAR protein involved in a positive regulation of ABA signaling along fruit receptacle ripening process. Also, belonging to Cluster 2R, there are two genes coding a similar N-terminal C2 domain-containing protein (*gene09729* and *gene19113*). One of them, *gene19113*, shows high level of induction and high specificity in ripe receptacle (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). The putative regulatory function of these proteins remains to be elucidated.

*Gene21905* encodes a putative BOP/NPR1/NIM-like regulatory protein (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). This kind of proteins is called BTB-ankyrins proteins because they contain two conserved protein-protein interactions motifs: a BOP/BOZ domain at the N-terminus and four ankyrins motifs near the C-terminus (Khan *et al.*, 2014). These domains were also present in the FaBOP bioinformatically deduced protein. Functionally, these BTB-ankyrin proteins are considered as plant-specific transcriptional co-activators (Khan *et al.*, 2014). The fact that the high over-expression of this gene in ripe receptacle and its specificity

of expression in strawberry fruits suggests that this protein could play an important regulatory role as co-activator of the expression of many ripening-related genes.

*Gene30997* encodes a Ran protein that belongs to the small GTP-binding proteins family and contains three ZnF-RB domains (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). Ran are small GTPases that are essential for nuclear transport and nuclear assembly and are primarily localized inside the nucleus. These proteins have been involved in the plant response to hormone or environmental signalling as salt stress or cold tolerance (Zang *et al.*, 2010; Xu and Cai, 2014).

*Gene05293* and *gene24830*, whose expression was receptacle-specific and also up-regulated in ripe receptacles, encode two different putative leucine-rich repeat (LRR) receptors (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). The protein deduced from the *gene05293* sequence contains five leucine-rich repeat constituting, at the N-terminal end of the protein, a typical domain of the LRR receptors. Additionally, in the C-carboxyl end a protein kinase domain is present. On the contrary, the deduced protein corresponding to *gene24830* presents four different leucine-rich repeat motifs organized as a leucine-rich repeats (LRRs), ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily domains that participate in protein-protein interactions. Both genes are included into Cluster 1R and it is worth highlight their elevated expression in red ripe receptacles compared to green receptacles and vegetative tissues. These putative receptors has not still functionally characterized in plants and the roled played along the strawberry fruit ripening process must be still determined.

SCF complexes (E3 ubiquitin ligases) are composed by different proteins as RING finger proteins, the scaffold culin 1 protein, and the substrate adaptor proteins, SKP1, Fbox (FBX), BTB, VHL, SOCs or DWD (WD40). The different combinatorial associations of these proteins render diverse assortment of adaptor that recruit specifically appropriate substrates for selective ubiquitylation by a wide range of different SCF ligases. These ligases bind, through the RING protein, the E2 ubiquitin ligases conjugating enzyme and bring together both the E2 and specific substrate targets. The catalytic core of these complexes is constituted by the interaction between culin and RING finger proteins (Hua and Viestra, 2011; Guzmán, 2012). The E3 ligases bring together a specific target and the E2 enzyme, and thereby coordinate the transfer of ubiquitin. The ubiquitylated proteins are selectively degraded by the 26S proteasome. The ubiquitylation is also reverted by the action of several types of deubiquitinases (DUBs). This ubiquitylation/deubiquitylation cycle could direct a number of nonproteolytic events involved in chromatin structure, transcription and vesicle trafficking (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). The individual FBX proteins and their cognate SCF complexes have been connected to almost all facets of plant physiology and development as sensors of light, control of cell cycle, gene

transcription, chromatin structure, stress responses, plant-pathogen defense etc. Additionally, SCF complexes also appear to participate, as hormone sensors or as component of hormone signalling pathways (auxins, GAs, ethylene, ABA, JA, strigolactones) (Hua and Viegas, 2011). Thus, in regards to ABA signalling pathway, it has been proved that SKP1 is involved in abscisic acid signalling to regulate seed germination, stomatal opening and root growth in *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2012). Therefore, SKP1 is involved in ABA signalling and may positively regulate ABA signalling by SCF-mediated protein degradation (Li *et al.*, 2012). In our arrays and belonging to Cluster 1R, we have detected two genes corresponding to RING-finger proteins (*gene27006* and *gene30404*), two genes coding SKP1 proteins (*gene18503* and *gene18505*), three genes corresponding to E3-ubiquitin ligases (*gene10350*, *gene16196* and *gene31679*) and three genes (*gene00322*, *gene09873* and *gene22281*) that putatively code different F-box proteins (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). All of these genes are characterized by a fruit-specific expression as well as a high amount of transcript within the receptacle red-ripe transcriptome, suggesting an important regulatory role for these proteins along the fruit ripening process mediated by ABA.

Similarly, included in Cluster 2R, 3R and 4R appear genes that code for the SCF complex elements (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20), suggesting that proteolytic protein regulation throughout ubiquitination is a complex process under a differential hormonal regulation along development and ripening stages.

Table 6: Manual annotation of differentially regulated genes coding for transcription factors sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

Transcription factors		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene24494	AGAMOUS (FaSHP)	5,938	8,16E-04	5907,602	<i>Fragaria x ananassa</i>	8E-177	AGU92563.1	Daminato, M. 2013
gene07057	AP2 domain class transcription factor	3,891	2,31E-03	4262,951	<i>Malus x domestica</i>	3E-74	GU732439	
gene32084	AP2/ERF domain-containing transcription factor	4,481	1,32E-02	851,933	<i>Populus trichocarpa</i>	6E-63	XM_002304518	
gene30478	basic helix-loop-helix	6,539	3,66E-03	791,585	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-20	NM_179381	
gene20865	BEL1 homeodomain protein	5,277	1,13E-03	751,109	<i>Vitis vinifera</i>	2E-80	XM_002277567	
gene25547	C2H2L domain class transcription factor	10,435	1,44E-03	1333,306	<i>Malus x domestica</i>	3E-38	HM122497	
gene32526	Dof zinc finger protein	35,854	2,62E-03	2268,309	<i>Medicago truncatula</i>	3E-49	XM_003602109	
gene13212	SCARECROW-LIKE transcription factor (FaSCL8)	5,087	5,05E-04	19090,26	<i>Fragaria x ananassa</i>	2E-156	XM_002305878	Pillet, 2015
gene12519	LURP-one-related protein (Tubby C 2 domain containing protein)	328,446	1,43E-03	924,15	<i>Vitis vinifera</i>	2E-77	XM_002278173	
gene29766	NAC domain protein	23,533	5,20E-04	3718,698	<i>Populus trichocarpa</i>	6E-117	XM_002305738	
gene28435	R2R3 MYB transcription factor (FaEOBII)	25,21	1,57E-03	3198,538	<i>Fragaria x ananassa</i>	8E-82	KM099230	Medina-Puche, L. 2015
gene31413	R2R3 MYB transcription factor (FaMYB10)	417,84	3,79E-04	25737,348	<i>Fragaria x ananassa</i>	1E-41	EU155162	Medina-Puche, L. 2014
gene25060	R2R3 MYB transcription factor (TT2)	129,981	3,85E-04	1398,983	<i>Rosa rugosa</i>	6E-46	FR828543	
gene28720	WRKY transcription factor	120,181	4,48E-04	11400,684	<i>Medicago truncatula</i>	5E-62	XM_003617375	

(table continues on following page)

Transcription factors		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene19478	WRKY transcription factor	10,244	2,36E-03	1327,876	<i>(Populus tomentosa x P. bolleana) x P. tomentosa</i>	2E-82	GQ377448	
gene01340	WRKY transcription factor	28,846	4,11E-04	2564,835	<i>Solanum tuberosum / Malus x domestica</i>	1E-47	AB061245 / HM122717	
gene26009	ZF-HD homeobox protein	2,109	7,51E-03	2083,591	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-30	XP_002306048.1	
<b>CLUSTER 2</b>								
gene21047	AP2 domain class transcription factor	4,972	4,83E-04	1269,657	<i>Malus x domestica</i>	1E-45	GU732462	
gene23830	bHLH transcription factor	19,922	1,04E-04	6757,179	<i>Medicago truncatula</i>	2E-39	XM_003611682	
gene02417	General transcription factor IIH subunit	3,01	1,29E-03	2023,13	<i>Medicago truncatula</i>	6E-97	XM_003601023	
gene13301	HSF domain class transcription factor	2,184	2,47E-03	3060,134	<i>Malus x domestica</i>	1E-57	HM122592	
gene19715	R2R3 MYB transcription factor	58,178	5,58E-04	1472,388	<i>Medicago truncatula</i>	4E-52	XM_003601151	
gene09407	R2R3 MYB transcription factor	2,212	1,76E-03	3987,974	<i>Fragaria chiloensis</i>	8E-116	GQ867222	Salvatierra, A. 2013
gene30204	transcription factor PCL1	19,494	4,73E-04	729,478	<i>Prunus persica</i>	2E-122	XP_007205582	
<b>CLUSTER 3</b>								
gene07304	AP2 domain class transcription factor	7,65	5,99E-04	1724,632	<i>Malus x domestica</i>	4E-43	GU732450	
gene04916	AP2/ERF domain-containing transcription factor	48,27	6,43E-04	3416,356	<i>Populus trichocarpa</i>	7E-37	XM_002327017	
gene28601	B3 domain-containing protein	3,748	1,38E-03	1146,75	<i>Glycine max</i>	1E-32	XM_003516732	
gene08699	C2H2L domain class transcription factor	2,785	9,23E-04	4424,90	<i>Malus x domestica</i>	7E-179	HM122505	
gene28452	C2H2L domain class transcription factor	5,99	5,62E-04	1153,625	<i>Malus domestica</i>	1E-50	ADL36628	
gene12765	homeobox leucine zipper	11,57	3,72E-04	1171,102	<i>Rosa rugosa</i>	1E-118	AFP55588	
gene11419	MYB transcription factor	8,97	1,72E-03	7626,273	<i>Glycine max</i>	2E-58	DQ822914	
gene03712	MYB transcription factor	4,44	4,60E-04	4321	<i>Rosa rugosa</i>	8E-153	GU967443	
gene03865	MYB transcription factor	3,054	1,99E-03	4524,99	<i>Humulus lupulus</i>	2E-70	FR751555	

(table continues on following page)



Transcription factors		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
gene07251	NAC domain class transcription factor	2,483	1,57E-03	12917,73	<i>Malus x domestica</i>	7E-107	HM122664	
gene30439	NAC domain class transcription factor	5,16	5,59E-04	1275,898	<i>Malus domestica</i>	1E-152	ADL36805	
gene20686	NAC domain class transcription factor	19,69	3,79E-04	1754,341	<i>Malus x domestica</i>	7E-100	HM122660	
gene04424	NAC domain class transcription factor	5,61	8,07E-04	1212,353	<i>Malus domestica</i>	5E-159	ACI13682	
gene32251	YABBY	25,52	3,80E-04	2950,067	<i>Medicago truncatula</i>	8E-46	XM_003608713	
gene03713	bHLH transcription factor	74,05	1,74E-04	1343,654	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-43	NM_102343	
gene20299	WD repeat-containing protein	2,607	1,21E-03	5690,84	<i>Medicago truncatula</i>	1E-149	XM_003590588	
gene07210	WRKY transcription factor	11,46	4,94E-04	814,522	<i>Fragaria x ananassa</i>	3E-101	EU727547	Encinas-Villarejo, S. 2009
gene03411	WRKY transcription factor	417,18	1,34E-03	891,421	<i>Solanum tuberosum</i>	0.0	AK329902	
gene09147	WRKY transcription factor	6,25	6,02E-04	1959,55	<i>Nicotiana tabacum</i>	4E-81	AB041520	
gene13452	Zinc finger and SCAN domain-containing protein	7,26	4,97E-04	2184,342	<i>Medicago truncatula</i>	1E-72	XM_003604615	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene08033	basic-leucine zipper	3,567	3,46E-03	3544,80	<i>Humulus lupulus</i>	7E-34	FN395065	
gene11645	FAR1 DNA-binding domain containing protein	3,33	3,87E-02	1749,296	<i>Malus domestica</i>	3E-16	XP_008367213	
gene32427	General transcription factor IIE subunit2	2,177	3,39E-03	2775,236	<i>Medicago truncatula</i>	1E-74	XM_003590008	
gene17037	MADS-box transcription factor 22-like	3,377	2,52E-03	2257,018	<i>Malus x domestica</i>	3E-54	HM122489	
gene23226	LOB domain-containing protein	3,143	1,14E-03	4925,558	<i>Glycine max</i>	1E-69	XM_003556167	
gene01153	zinc finger CCCH domain-containing protein 3	2,193	1,65E-03	2161,806	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-53	NM_119321	

Table 7: Manual annotation of differentially regulated genes coding for signalling and regulatory proteins sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene21905	BOP/NPR1/NIM1 regulatory protein	28,876	6,32E-04	1952,712	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002308869	
gene26483	DVL	4,486	1,03E-03	11234,476	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-20	BK001754	
gene19112	C2 domain containing protein elicitor responsive gene	447,572	1,10E-03	22676,928	<i>Oryza sativa</i>	1E-25	AF090698	
gene26501	C2 domain containing protein elicitor responsive gene	9,483	6,50E-04	840,288	<i>Medicago truncatula</i>	1E-54	XM_003616359	
gene05089	hypersensitive reaction associated Ca2+-binding protein	2,055	2,57E-03	19185,487	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3E-50	AF145386	
gene32454	multiple C2 and transmembrane domain-containing protein	5,232	7,42E-04	26361,513	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002271554	
gene10659	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 5	12,939	5,40E-04	1087,751	<i>Glycine max</i>	4E-94	XM_003517865	
gene02110	ras-related protein RHN1-like isoform X1	4,381	5,53E-04	7385,48	<i>Malus domestica</i>	4E-127	XP_008337431	
gene31093	WD40 domain containing protein	5,865	6,79E-04	5423,75	<i>Solanum tuberosum</i>	0.0	XP_006358293	
gene21168	WD-repeat protein	12,423	1,98E-03	1747,34	<i>Malus domestica</i>	0.0	XP_008376375	
<b>KINASES</b>								
gene23258	adenosine kinase	6,06	4,76E-04	13527,151	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002272301	
gene06226	Pantothenate kinase	20,752	3,78E-04	45073,96	<i>Medicago truncatula</i>	1E-160	XM_003601211	
gene15532	protein kinase domain-containing protein	15,196	4,57E-04	6490,259	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_111649	
gene31007	protein kinase-like protein	6,442	5,13E-04	1227,64	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-106	NM_128240	
gene22182	sensor kinase (CSK)	6,727	6,84E-04	14678,543	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_105452	

(table continues on following page)

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>KINASES</b>								
gene30640	serine/threonine protein kinase	3,744	6,19E-04	2730,391	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003608235	
gene13564	serine/threonine protein kinase	6,936	6,15E-04	1928,308	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_180212	
gene20321	serine/threonine-protein kinase	7,196	4,83E-04	2113,035	<i>Vitis vinifera</i>	1E-148	XM_002272976	
gene32170	serine/threonine-protein kinase HT1-like	3,014	1,02E-03	5739,779	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003549582	
gene17422	serine/threonine-protein kinase OXI1 (AGC2-1)	11,071	4,55E-04	3531,296	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-117	NM_113431.5	
gene30997	Zinc finger Ser/Thr protein kinase	23,606	3,68E-04	5345,349	<i>Medicago truncatula</i>	4E-63	XM_003609219	
<b>RECEPTORS</b>								
gene05293	leucine-rich repeat family protein (FaRPK)	23,737	4,07E-04	10812,41	<i>Glycine max</i>	3E-126	FJ014728	
gene24830	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	148,678	0,00197	1418,95	<i>Vitis vinifera</i>	5E-69	XM_003633734	
gene23598	receptor protein	10,254	4,42E-03	821,599	<i>Vitis vinifera</i>	1E-146	XM_003633996	
gene30661	receptorprotein kinase (RKS1)	5,199	7,36E-04	622,054	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	AF084035	
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene10081	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	3,666	1,21E-03	2713,808	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-62	NM_125180	
gene09579	E3 ubiquitin-protein ligase	2,004	1,80E-03	2149,05	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008239171	
gene09873	F-box family protein	170,203	1,88E-03	1065,77	<i>Populus trichocarpa</i>	4E-53	XM_002307964	
gene22281	F-box proteins	127,819	3,83E-04	2504,649	<i>Pyrus pyrifolia</i>	9E-08	AB545982	
gene00322	F-box/FBD/LRR-repeat protein	2,573	5,88E-03	735,698	<i>Medicago truncatula</i>	4E-88	XM_003589259	
gene08799	protein PEROXIN-4 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2)	2,219	1,48E-03	23217,95	<i>Cucumis melo</i>	2E-111	XP_008445030	
gene30404	RING finger protein	4,673	7,27E-04	2100,81	<i>Medicago truncatula</i>	2E-73	XM_003637350	
gene27006	RING-H2 finger protein	29,375	5,26E-04	9615,67	<i>Medicago truncatula</i>	8E-23	XM_003590265	
gene18503	Skp1/Ask1 protein (FaSKP1)	104,06	1,40E-03	28553,73	<i>Hevea brasiliensis</i>	1E-30	HM640272	

(table continues on following page)

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene18505	SKP1-like protein	67,497	4,04E-04	16857,907	<i>Medicago truncatula</i>	3E-08	XM_003616811	
gene31679	ubiquitin	20,403	5,18E-04	3251,957	<i>Artemisia annua</i>	5E-11	GQ901904	
gene30186	ubiquitin fusion degradation UFD1	4,758	8,42E-04	1708,866	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-151	NM_201828	
gene16196	ubiquitin protein ligase	33,231	1,48E-03	1616,508	<i>Medicago truncatula</i>	4E-63	XM_003602578	
<b>CLUSTER 2</b>								
gene09729	C2 domain-containing protein	2,801	2,10E-03	1064,908	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_006376379	
gene19113	C2 domain-containing protein	16,454	1,44E-03	2484,958	<i>Oryza sativa</i>	4E-26	NM_001054079	
<b>KINASES</b>								
gene13428	leucine-rich repeat protein kinase	2,205	7,23E-03	732,812	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0	NM_124535	
gene19366	phosphoribulokinase/uridine kinase domain protein	2,334	2,47E-03	1673,079	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6E-10	NM_001202566	
gene20400	serine/threonine-protein kinase	3,584	2,03E-03	2726,689	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003555999	
gene01144	serine/threonine-protein kinase	4,032	1,90E-03	1051,895	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-122	NM_112761	
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene18983	F-box family protein	7,323	8,09E-04	889,343	<i>Populus trichocarpa</i>	0	XM_002301353	
gene02131	F-box proteins	2,113	2,72E-03	1015,216	<i>Pyrus pyrifolia</i>	2E-23	AB545981	
gene04008	RING/U-box domain-containing protein	3,899	1,87E-03	1072,999	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-09	NM_118773	
<b>RECEPTORS</b>								
gene05774	rhodopsin-like receptor	2,367	1,22E-03	5346,8	<i>Zea mays</i>	7E-63	NM_001157389	
gene26891	odorant receptor domain containing protein(odr-4 homolog)	4,504	8,65E-03	1452,98	<i>Prunus persica</i>	1E-179	XP_008219186	
<b>CLUSTER 3</b>								
gene09629	interactor of constitutive active ROPs	8,20	5,25E-04	1001,321	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6E-126	NM_129264	

(table continues on following page)

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
gene13280	Remorin	5,65	1,03E-03	1229,809	<i>Ricinus communis</i>	1E-45	XP_002510796	
gene21177	small G protein family protein	4,70	5,19E-04	1163,741	<i>Arabidopsis lyrata</i>	2E-151	XM_002864690	
gene07367	SnRK2 calcium sensor	2,902	3,53E-03	1434,00	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	1E-175	FJ882981	
gene18826	syntaxin	11,14	2,10E-04	3704,822	<i>Glycine max</i>	1E-21	XM_003554411	
gene20494	transducin family protein / WD-40 repeat family	3,95	7,62E-04	3314,72	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9E-164	NM_130366	
gene07026	transducin/WD-40 repeat-containing protein	6,48	4,08E-04	9900,003	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-135	NM_102297	
gene05178	two-component response regulator ARR2 isoform X1	14,57	4,32E-04	2361,17	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_8223286	
gene20299	WD repeat-containing protein	2,607	1,21E-03	5690,84	<i>Medicago truncatula</i>	1E-149	XM_003590588	
<b>KINASES</b>								
gene15486	Avr9/Cf-9 induced kinase	27,37	3,79E-04	3214,94	<i>Nicotiana tabacum</i>	5E-158	AY220481	
gene05792	CBL-interacting protein kinase	8,68	4,08E-04	1602,459	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-120	DQ997692	
gene16298	cyclin-dependent kinase	2,143	1,47E-03	2370,38	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	XM_002873402	
gene00913	hydroxyethylthiazole kinase	2,049	4,14E-03	1189,11	<i>Arabidopsis lyrata</i>	2E-76	XM_002883451	
gene16699	kinase	3,769	1,37E-03	825,39	<i>Ricinus communis</i>	2E-26	XP_002513567	
gene16513	kinase	5,75	9,56E-04	2221,244	<i>Theobroma cacao</i>	0.0	EOY11134	
gene17121	lectin protein kinase	7,98	5,77E-04	1021,565	<i>Populus nigra</i>	0.0	AB030083	
gene11097	mitogen-activated protein kinase	18,19	6,97E-04	1113,888	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-71	NM_116919	
gene11098	mitogen-activated protein kinase	4,66	6,44E-04	2495,939	<i>Glycine max</i>	1E-94	XM_003544724	
gene09806	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	5,21	9,01E-04	726,609	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_001202923	
gene15891	Serine/threonine protein kinase	10,73	4,17E-04	1052,508	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003604077	
gene19993	Serine/threonine-protein kinase	26,60	5,69E-04	6716,811	<i>Theobroma cacao</i>	4E-72	EOY02771	
gene29765	serine/threonine-protein kinase	3,442	1,34E-03	3815,13	<i>Glycine max</i>	4E-135	XR_137280	
gene34758	Serine-threonine protein kinase	10,66	1,34E-04	3351,558	<i>Ricinus communis</i>	1E-60	XM_002515360	
gene30692	sphingosine kinase	4,21	1,32E-03	1892,259	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XP_002270943	

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene03647	E3 ubiquitin-protein ligase	4,39	1,51E-03	2827,567	<i>Vitis vinifera</i>	2E-47	XP_002283507	
gene09853	F-box family protein	7,80	2,52E-03	1223,653	<i>Populus trichocarpa</i>	3E-40	XM_002307964	
gene16754	F-box family protein	3,77	2,35E-03	2953,936	<i>Populus trichocarpa</i>	3E-70	XM_002308681	
gene01188	F-box protein	2,666	9,90E-04	1194,41	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-167	NM_104435	
gene16752	F-box protein	4,18	2,37E-03	1203,989	<i>Solanum lycopersicum</i>	1E-83	XP_004304799	
gene03306	polyubiquitin	3,124	3,28E-03	4193,87	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	L05361	
gene10171	RING-H2 finger protein	3,318	1,25E-03	3108,40	<i>Prunus mume</i>	2E-143	XP_008219359	
gene12032	RING-H2 finger protein	7,98	4,73E-04	868,89	<i>Prunus persica</i>	2E-144	XP_008219359	
gene32106	RING-H2 finger protein	137,02	4,01E-04	1200,18	<i>Prunus persica</i>	9E-75	XP_007210150	
gene31702	RING-H2 finger protein	3,631	1,19E-03	10416,78	<i>Medicago truncatula</i>	1E-34	XM_003601970	
gene03637	RING-H2 finger protein	4,36	6,88E-04	1426,00	<i>Arabidopsis lyrata</i>	8E-32	XM_002892803	
gene19216	Ubiquitin	102,13	4,17E-04	10609,485	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-21	U84967	
gene23984	Ubiquitin	3,99	2,31E-03	1545,215	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003616928	
<b>RECEPTORS</b>								
gene13148	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine kinase	11,27	1,83E-04	6464,646	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003555349	
gene19496	proline-rich receptor-like protein kinase	3,615	5,31E-04	1199,49	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003547220	
gene30199	Receptor protein kinase	84,48	3,83E-04	1221,866	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003629955	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene28810	BON1-associated protein	3,035	9,25E-04	1905,616	<i>Solanum tuberosum</i>	1E-32	XM_006339390	
gene04419	C2 domain-containing family protein	3,401	1,35E-03	1347,888	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002311329	
gene13353	C2 domain-containing family protein	3,389	1,67E-03	955,542	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_006376379	
gene31011	Calmodulin protein	3,355	1,51E-03	1639,9	<i>Medicago truncatula</i>	1E-42	XM_003602046	

(table continues on following page)

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 4</b>								
gene24536	Cyclin	3,073	2,17E-03	1841,267	<i>Medicago truncatula</i>	5E-111	XM_003622816	
gene20449	flowering time control protein FY (WD40 domain containing protein)	4,63	1,86E-02	828,33	<i>Malus domestica</i>	2E-93	XP_008375316	
gene12722	pleckstrin homology domain-containing family protein	2,328	1,48E-03	7192,243	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002302098	
gene11610	protein phosphatase 2C	2,302	1,41E-03	8840,02	<i>Hevea brasiliensis</i>	1E-155	EU827608	
gene32677	protein phosphatase 2C	2,302	2,61E-03	1119,714	<i>Glycine max</i>	2E-171	XM_003530462	
gene10002	SPX domain-containing protein	2,226	1,14E-03	1242,786	<i>Vitis vinifera</i>	1E-126	XM_002283854	
gene28410	syntaxin	2,195	8,07E-04	775,611	<i>Ricinus communis</i>	5E-82	XM_002521518	
gene13840	syntaxin	2,198	1,20E-03	1485,318	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-115	XM_002316191	
gene23602	syntaxin	2,196	1,07E-03	829,392	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-138	XM_002316205	
gene11741	syntaxin	2,287	4,76E-03	1129,414	<i>Glycine max</i>	1E-111	NM_001254606	
gene08498	transducin	2,168	7,33E-03	994,454	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-170	XM_002321649	
gene05851	transducin	3,031	1,29E-03	3352,222	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	XM_002892822	
<b>KINASES</b>								
gene24690	Dephospho-CoA kinase	2,994	2,35E-03	1764,206	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-26	NM_179771	
gene14737	Dephospho-CoA kinase	2,986	3,00E-03	1562,265	<i>Medicago truncatula</i>	6E-102	XM_003593562	
gene04334	Dephospho-CoA kinase	2,978	3,05E-03	3340,466	<i>Medicago truncatula</i>	8E-100	XM_003625853	
gene23153	Protein kinase and PP2C-like domain-containing protein	2,306	1,15E-03	870,929	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003590198	
gene20924	serine/threonine/tyrosine kinase	2,234	2,63E-03	7494,025	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-51	XM_006382154	
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene00483	E3 ubiquitin-protein ligase	2,857	2,36E-03	785,12	<i>Glycine max</i>	0.0	NM_001282242	
gene09018	E3 ubiquitin-protein ligase	2,847	8,11E-03	960,926	<i>Medicago truncatula</i>	3E-127	XM_003615287	
gene14751	E3 ubiquitin-protein ligase	2,845	2,19E-03	1659,639	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003618721	
gene17739	E3 ubiquitin-protein ligase	3,281	2,98E-02	3346,186	<i>Glycine max</i>	1E-123	XM_003539490	
gene09190	E3 ubiquitin-protein ligase	2,843	1,80E-03	1102,593	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_120366	
gene14115	E3 ubiquitin-protein ligase	3,566	1,25E-03	3354,01	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008223431	
gene11337	EID1-like F-box protein	2,808	2,47E-03	2500,017	<i>Vitis vinifera</i>	2E-122	XM_002276292	

(table continues on following page)

Signalling and Regulatory Proteins		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 4</b>								
<b>PROTEOLITIC PROTEIN REGULATION</b>								
gene15211	F-box protein family	2,743	8,60E-03	964,801	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	2E-30	XM_002871233	
gene30954	F-box protein	2,703	1,77E-03	815,817	<i>Medicago truncatula</i>	3E-65	XM_003624710	
gene21896	F-box/RNI protein	2,696	2,50E-03	1077,042	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-174	NM_100954	
gene01044	F-box/LRR-repeat protein	2,299	1,58E-03	746,853	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-18	NM_117470	
gene02007	Frataxin, mitochondrial precursor	2,255	1,14E-03	1081,93	<i>Prunus mume</i>	2E-83	XP_008230187	
gene15931	PRLI-interacting factor	2,321	6,29E-03	806,102	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-94	NM_121997	
gene24708	proteasome activating protein	2,317	1,67E-03	7671,219	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_112178	
gene32136	RING finger protein	2,182	9,45E-03	815,39	<i>Prunus persica</i>	8E-18	XP_007200789	
gene23698	Ubiquitin carrier protein	2,159	1,08E-03	4186,952	<i>Medicago truncatula</i>	2E-87	XM_003608898	
gene24090	Ubiquitin extension protein	2,159	2,35E-03	73022,762	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-74	XM_002322782	
gene11179	Ubiquitin family protein	2,158	2,73E-03	1394,006	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002309840	
gene24698	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein	2,158	2,88E-03	15916,151	<i>Populus trichocarpa</i>	8E-101	XM_002309518	
gene14941	Ubiquitin-specific protease	2,157	5,05E-03	745,522	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002300134	
<b>RECEPTORS</b>								
gene03054	probable receptor-like protein kinase	4,444	1,14E-03	34817,81	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009376146	



Hormonal related genes

A number of plant regulators including auxins, ethylene, gibberellins and abscisic acid (ABA) have been proposed as implicated in the control of berry development and ripening (Symons *et al.*, 2012; McAtee *et al.*, 2013; Kuhn *et al.*, 2014; Fortes *et al.*, 2015). Our microarrays analysis may shed light regarding the physiological role played by these hormones in these important fruit processes.

Abscisic acid (ABA) metabolism and signaling

In plants, ABA biosynthesis proceeds through the plastid-localized 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway (Cazzonelli and Pogson, 2010). Our microarray analyses have shown the up-regulation of the expression of some of the genes that form part of this crucial pathway, such as, *phytoene synthase* (*gene28765*), which is the enzyme generally accepted as being the most important regulatory enzyme of ABA biosynthesis pathway, *beta-carotene hydroxylase* (*gene13195*) *neoxanthin synthase* (*gene10665*), *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* (*FaNCED1*) (*gene30616*), and other key regulatory enzyme short chain dehydrogenase (*gene06565*). Interestingly, we have not observed any up-regulation of those genes specifically related to MEP pathway whose expression belongs to Cluster1R. However, the expression profile of a gene that could codify a *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase* (*gene20709*), a MEP pathway regulatory enzyme, is present in Cluster 3R (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21). NCED enzyme is universally considered as the key enzyme in the biosynthesis pathway of ABA. In strawberry fruit receptacle, the silencing of *FaNCED1* expression (*gene30616*), motivated a reduction of the ABA content as well as a diminution of the amount of anthocyanin in ripen fruit receptacle (Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). These results indicate clearly that a receptacle ABA biosynthetic pathway is present and induced in fruit receptacle along the ripening is being up-regulated positively by the endogenous production of ABA. In a previous work Symons *et al.* (2012) showed that there is a slight but continuous increase in the receptacle ABA content between large green and large white fruit growth stages. This slight increase of ABA production was followed by a dramatic increase in the content of this hormone in the last pink and red stages of fruit ripening (Symons *et al.*, 2012). In this sense, an autocatalytic endogenous production of ABA along the receptacle ripening could be necessary to support the drastic increase in ABA production in ripe receptacles that plays an important physiological role in the strawberry fruit ripening process.

Besides, genes involved in the isoprenoid mevalonate (MVA) pathway as *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* gene (*gene13004*), belongs to Cluster 1R, while those that code a

*farnesyl diphosphate synthase* (*gene01502*) or *diphosphomevelonate decarboxylase* (*gene23657*) are included in Cluster 3R, as well as other genes related with the terpenoid metabolism (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21).

Interestingly, genes that code enzymes related to the production of aromatic terpenes, as *linalool synthases* (*genes24676* and *gene30669*) pertain to Cluster 1R (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21). However, other genes that potentially encode enzymes of the terpene metabolism as *myrcene* and *terpene synthase genes* (*gene23887* and *gene23886*, respectively) are included in Cluster 2R, while a gene corresponding to the biosynthesis of the pentacyclic triterpene, *beta-amyrin synthase* (*gene05525*), is included in Cluster 3R (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21). All this data show us a complex interactive regulatory network between ABA and auxins in the regulation of the expression pattern of many isoprenoid and ripening related genes. Of all these genes, only the expression of genes coding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, linalool synthase, myrcene synthase, terpene synthase were fruit specific, indicating a more specific function in the strawberry fruit ripening process

Recently, many of the molecular mechanisms of ABA-associated signaling components have been identified in *Arabidopsis thaliana*. For instance: G-proteins, phospholipase C/D, protein kinases such as receptor like kinases, SNF1-related kinases (SnRKs), calcineurin B-like protein kinases, calcium-dependent protein kinases, mitogen activated protein kinases, protein phosphatases type 2C, and different classes of transcription factors as MYB, bZIP, Apetala 2 and WRKY (Cutler *et al.*, 2010). In our microarray analysis, included into the signaling and regulatory functional group, we have identified a gene that codes for a SnRK2 calcium sensor (*gene07367*) and two mitogen-activated protein kinases (*gene11097* and *gene11098*) within Cluster 3R of signaling and regulatory functional group. Additionally, we have identified three genes (*gene11610*, *gene32677* and *gene23153*) coding for protein phosphatases type 2C belonging to Cluster 4R (Table 7; Additional files, Chapter 2, Additional table 20). Intriguingly, the expression of these genes is not influenced by the endogenous production of ABA inside the fruit receptacle what suggest that the function of these putative signaling proteins can be not directly related with the ABA signaling pathway. Similarly, a great number of transcription factors pertaining to the four ripening-related clusters have been identified in our microarray (Table 6; Additional files, Chapter 2, Additional table 19). These results give us an idea of the complex hormonal regulation of the ABA-associated signaling components that are acting along the ripening of the fruit which still must be clarified.

### *Auxins*

As we have previously indicated, in strawberry fruit receptacle, it was proposed that auxins synthesized by achenes promote the expansion of the receptacle cells during the early stages of fruit development determining the size of the fruit receptacle. However, the role played for this hormone along receptacle ripening is really poorly understood. Recently, the auxins content of strawberry fruit along the growth and ripening processes has been studied (Symons *et al.*, 2012). The IAA level in plants is modulated by a specific group of amidohydrolases (ILL2 amidohydrolases) that release the active hormone from its auxin-amino acid conjugated storage forms (Bitto *et al.*, 2009). We have detected in Cluster 1R two genes that code an iaa-amino acid hydrolase (*gene15614*) and a SAUR protein (*gene14862*) whose expression was fruit-specific. Only others auxin-related proteins coding genes were found as over-expressed along fruit ripening and belonging to Cluster 1R (*gene22252*, *gene28375*, *gene08921* and *gene08336*) and Cluster 3R (*gene34980*) (Table 8; Additional file, Chapter 2, Additional file 21). However, the expression of any of them was fruit specific, indicating their involvement in general auxin-related processes. All this data suggest that auxins do not play an important role in the fruit receptacle ripening process.

### *Ethylene*

It is very well established, that ethylene is a plant hormone that regulates the ripening process in climacteric soft fruits (Cherian *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014). However, the physiological role played for this hormone in strawberry fruit ripening, if any, it is very poorly known.

Our transcriptomic analysis showed that only a few genes related with ethylene metabolism were ripening-related. Out of them, four genes encode different 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidases (*gene11424*, *gene11421*, *gene15694* and *gene32005*). Two of these genes (*gene11424* and *gene11421*) belong to Cluster 1R, while *gene15694* and *gene32005* are included in Cluster 4R. Besides, a gene that encodes an ethylene-forming-enzyme dioxygenase (*gene30779*) also belongs to Cluster 1R (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21). Of all these genes, only the expression of the gene coding the ethylene-forming-enzyme dioxygenase was high in fruit receptacle transcriptome and also presented a fruit-specific expression. All these data indicate that probably ethylene does not play a very relevant role in the strawberry receptacle fruit ripening process, though a minor role can not be disclosed as previously proposed (Trainotti *et al.*, 2005; Merchante *et al.*, 2013).

### *Gibberellins*

In strawberry, there is very scarce information related with the functional physiological roles that play gibberellins (GAs) during strawberry fruit growth and ripening process. All these observation related to the physiological role played by GAs along the fruit ripening process are very indirect. It was observed that GA<sub>3</sub> did not stimulate growth when applied to fruits from which achenes had been removed (Dreher and Povaiah, 1982). In addition, it was reported that the exogenous application of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) to strawberry fruits delayed the development of red color (Martínez, 1996). Later, Bustamante *et al.* (2009) described a reduction of the protein and mRNA levels of the ripening-related and fruit-specific enzyme  $\beta$ -xylosidase after the application of GA<sub>3</sub> to strawberry white fruits. Recently, a very preliminary study has suggested that gibberellins could be involved in the development and ripening of the fruit receptacle (Csukasi *et al.*, 2011). In this study high levels of GA<sub>4</sub> in fruit receptacle were indicated (Csukasi *et al.*, 2011). However, in a recent report, this latter study have been questioned and support the proposal that the early 13-hydroxylation pathway that produces GA<sub>1</sub> it is really the key pathway that renders bioactive GAs in strawberry fruits (Symons *et al.*, 2012). In this report only detectable levels of GA<sub>1</sub> were observed while others bioactive GAs as GA<sub>3</sub> and GA<sub>4</sub> were below detection limits. Additionally, a sharp decrease of both IAA and GA<sub>1</sub> levels along fruit ripening was detected (Symons *et al.*, 2012). These studies suggest that giberellins could play a dual regulatory physiological role, first promoting receptacle growth in combination with auxins produced in the achenes, and afterwards playing a relevant role related to the receptacle ripening process. Our microarray studies have shown only the up-regulation of the expression of two genes, belonging to Cluster 1R and involved in the biosynthesis of gibberellins, in ripe fruit receptacle. These genes appear to encode a GA2-oxidase (*gene31337*), a catabolic enzyme that inactive bioactive gibellerins, and a GA20-oxidase (*gene18930*), a regulatory enzyme involved in the gibellerin biosynthesis. Both genes present high levels of transcription within the transcriptome of the mature fruit receptacle. Besides, the expression of both genes was quite receptacle specific suggesting a metabolic function restricted to mature receptacle (Table 8; Additional files, Chapter 2, Additional table 21). A similar increase in the expression of a gene that encodes a FaGA2ox protein along strawberry fruit ripening was previously reported (Csukasi *et al.*, 2011). Gibberellin homeostasis is maintained by the balance between their rates of biosynthesis and deactivation. Thus, our results are partially contradictory with those reported previously (Csukasi *et al.*, 2011), as far as, an up-regulation of a regulatory gibberellin biosynthetic gene along the receptacle ripening process was observed. Our microarray study does not support an important role for GAs on the ripening process.

Table 8. Manual annotation of differentially regulated hormonal-related genes sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

Hormonal-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated							
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference	
<b>CLUSTER 1</b>									
<b>AUXINS</b>									
gene13601	auxin efflux carrier component	3,994	6,03E-04	1085,289	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002323654		
gene22252	auxin-induced protein	17,972	7,54E-04	40122,49	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003531870		
gene28375	auxin-induced protein	12,131	2,02E-03	1721,586	<i>Glycine max</i>	5E-122	XM_003530787		
gene08921	auxin-induced protein	4,152	1,18E-03	17740,012	<i>Glycine max</i>	1E-158	XM_003525807		
gene08336	auxin-responsive protein	2,487	2,01E-03	3174,778	<i>Glycine max</i>	2E-63	XM_003541323		
gene15614	iaa-amino acid hydrolase 1	2,799	1,40E-03	3235,846	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-90	XM_002308417		
gene14862	SAUR family protein	4,24	1,36E-03	3559,66	<i>Populus trichocarpa</i>	4E-45	XM_002310820		
<b>ETHYLENE</b>									
gene11424	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	27,618	1,14E-03	1228,672	<i>Ricinus communis</i>	8E-159	XM_002514098		
gene11421	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	29,837	3,83E-04	1678,318	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-157	NM_127517		
gene30779	ethylene-forming-enzyme dioxygenase	39,987	3,77E-04	51084,429	<i>Prunus armeniaca</i>	5E-86	U97530		
<b>GIBBERELLINS</b>									
gene31337	GA2-oxidase	14,226	4,67E-04	7839,832	<i>Pyrus communis</i>	4E-161	JF441168		
gene18930	gibberellin 20 oxidase	6,589	5,47E-04	5183,161	<i>Vitis vinifera</i>	1E-95	XM_002284938		

(table continues on following page)

Hormonal-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>ISOPRENOIDS, TERPENOIDS AND ABA METABOLISM</b>								
gene13004	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	3,45	1,61E-03	8679,84	<i>Malus x domestica</i>	0.0	EF580921	
gene30616	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (FaNCED1)	3,322	2,62E-03	6688,363	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	ADU85829.1	Jia <i>et al.</i> , 2011
gene13195	beta-carotene hydroxylase	3,33	8,10E-04	3261,147	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	KC967656	
gene24676	linalool synthase	10,453	3,79E-04	7798,971	<i>Actinidia arguta</i>	1E-168	GQ338153	
gene30669	linalool synthase (LIS)	11,549	5,49E-04	45913,4	<i>Malus x domestica</i>	0.0	JX848734	
gene10665	neoxanthin synthase (NSY)	4,345	5,37E-04	4320,998	<i>Malus x domestica</i>	3E-95	JN941557	
gene28765	phytoene synthase protein	8,001	6,45E-04	17310,031	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	FJ784889	
gene06565	short chain dehydrogenase	3,613	1,14E-03	29043,42	<i>Solanum tuberosum</i>	3E-87	AB192882	
gene32435	short chain dehydrogenase/reductase	36,45	4,01E-04	29440,95	<i>Nandina domestica</i>	3E-98	FJ789568	
<b>JASMONIC ACID</b>								
gene04119	S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase	107,15	3,73E-04	1193,469	<i>Arabidopsis lyrata</i>	7E-94	XM_002893011	
gene15184	jasmonate O-methyltransferase	203,162	1,69E-03	40959,424	<i>Vitis vinifera</i>	5E-120	XM_002281543	
<b>CLUSTER 2</b>								
gene28201	cytokinin-O-glucosyltransferase	2,856	1,75E-03	13527,736	<i>Medicago truncatula</i>	2E-152	XM_003615784	
<b>ISOPRENOIDS, TERPENOIDS AND ABA METABOLISM</b>								
gene23887	myrcene synthase	4,418	6,76E-04	2525,63	<i>Vitis vinifera</i>	8E-53	NM_001281080	
gene23886	terpene synthase	4,446	4,26E-03	5284,76	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-140	JF449453	
<b>CLUSTER 3</b>								
gene12478	12-oxophytodienoate reductase	4,02	5,40E-04	1511,13	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.0	NM_001246944	
gene15204	cytokinin oxidase	6,70	1,85E-03	1113,102	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002307645	
gene05631	germin-like protein	50,61	5,66E-04	1728,046	<i>Chimonanthus praecox</i>	1E-75	EU116342	

(table continues on following page)

Hormonal-related genes		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
<b>AUXINS</b>								
gene34980	auxin-induced protein	2,874	8,50E-04	4409,95	<i>Medicago truncatula</i>	5E-152	XM_003626384	
gene03935	SAUR family protein	4,21	1,11E-03	2563,24	<i>Malus domestica</i>	4E-89	XP_008354757	
gene12763	SAUR family protein	3,337	3,76E-03	2069,51	<i>Malus domestica</i>	2E-31	XP_008376800	
<b>ISOPRENOIDS, TERPENOIDS AND ABA METABOLISM</b>								
gene20709	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	6,19	3,66E-04	1773,386	<i>Hevea brasiliensis</i>	0.0	DQ473433	
gene05525	beta-amyrin synthase	217,62	9,98E-04	1037,386	<i>Malus x domestica</i>	0.0	AB055512	
gene23657	diphosphomevelonate decarboxylase	3,146	1,84E-03	3517,12	<i>Hevea brasiliensis</i>	0.0	AB294695	
gene01502	farnesyl diphosphate synthase	6,34	1,04E-03	5149,236	<i>Panax quinquefolium</i>	0.0	GQ401664	
<b>GIBBERELLINS</b>								
gene05020	gibberellin 2-oxidase	543,34	1,79E-03	1766,437	<i>Populus trichocarpa</i>	3E-127	XM_002301494	
<b>CLUSTER 4</b>								
<b>ETHYLENE</b>								
gene32005	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	14,363	2,27E-03	21539,965	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY706156	
gene15694	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	14,239	1,02E-02	1129,594	<i>Prunus domestica</i>	4E-86	AJ890087	
gene17480	ethylene-responsive transcription factor	2,802	1,61E-02	5047,316	<i>Medicago truncatula</i>	8E-59	XM_003610878	
<b>GIBBERELLINS</b>								
gene08518	GASA protein (GASA domain containing protein)	4,349	8,95E-04	7501,51	<i>Fragaria x ananassa</i>	2E-47	AF039183	Medina-Escobar. 1997
<b>ISOPRENOIDS, TERPENOIDS AND ABA METABOLISM</b>								
gene19729	perakine reductase	2,358	1,50E-03	1405,768	<i>Solanum tuberosum</i>	3E-159	XM_006347691	
gene23889	terpene synthase domain	3,106	2,71E-03	823,04	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008230162	

### Transporters

A large number of genes whose expression is up-regulated in ripen receptacle encode proteins that are involved in transport processes. For instance, several genes corresponding to ATP-binding cassette (ABC) and Multi-antimicrobial extrusion protein (MATE) transporters are components of Clusters 1R, 3R and 4R. Besides genes encoding glutathione S-transferases (GSTs), are also included in these three clusters (Table 9; Additional files, Chapter 2, Additional table 22).

Two major transport systems have been proposed for transport molecules across the tonoplast membrane. The primary transport is mediated by the ABC transporters while the secondary transport mechanism is based on the preexistence of a H<sup>+</sup> gradient across the vacuolar membrane that is produced by the action of a V- or P-ATPases or vacuolar H<sup>+</sup>pyrophosphatase (Martinoia *et al.*, 2007; Verweij *et al.*, 2008).

Several reports have shown clearly that different flavonoids and phenylpropanoids, as acylated anthocyanin, are transported inside the vacuole through MATE transporters (Gómez *et al.*, 2009 and 2011). Additionally, GSTs have also been involved in the vacuolar sequestration of anthocyanins (Conn *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2011). Interestingly, in Cluster 1R, there are located two genes (*gene31672* and *gene07028*) that encode a GST and a MATE protein, respectively. Similarly, to the flavonoids related genes, both genes are receptacle-specific and present a high amount of expression in ripen fruit (Table 9; Additional files, Chapter 2, Additional table 22). These datas suggest that both genes, in ripen fruits, could be related to the transport of anthocyanins within the vacuole.



Table 9. Manual annotation of differentially regulated genes coding for transporters sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

Transporters		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene00123	ABC transporter	7,58	4,24E-04	1788,617	<i>Vitis vinifera</i>	1E-165	XM_002281034	
gene22891	ABC transporter	10,379	4,10E-04	1055,205	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.0	AJ831379	
gene30234	ABC transporter	34,236	3,64E-04	4836,517	<i>Vitis vinifera</i>	2E-133	XM_002277136	
gene21322	adenine/guanine permease	7,178	5,84E-04	739,272	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_111933	
gene01994	equilibrative nucleotide transporter 3	8,871	6,25E-04	919,54	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008230198	
gene10386	glutathione S-transferase	6,61	4,86E-04	77511,06	<i>Glycine max</i>	7E-62	NM_001250784	
gene09427	glutathione S-transferase	698,211	1,44E-03	21314,41	<i>Glycine max</i>	6E-82	NM_001248057	
gene10387	glutathione S-transferase	9,558	1,02E-03	5451,908	<i>Cicer arietinum</i>	4E-99	XM_004488650	
gene10383	glutathione S-transferase	5,496	6,03E-04	137548,723	<i>Carica papaya</i>	1E-113	AJ000923	
gene31672	glutathione S-transferase	1215,977	8,36E-04	10454,536	<i>Malus x domestica</i>	3E-115	JN573600	
gene09426	glutathione S-transferase	68,032	5,91E-04	4297,895	<i>Lycopersicon esculentum</i>	7E-79	AY007561	
gene18167	glutathione-S-transferase	19,889	3,77E-04	45008,625	<i>Rheum australe</i>	2E-114	EU931209	
gene07028	mate efflux domain-containing protein	56,292	4,04E-04	6939,15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-40	NM_124290	
gene20514	oligopeptide transporter OPT family	3,252	2,51E-03	1537,641	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003625124	
gene01912	oligopeptide transporter OPT family	2,807	2,26E-03	2260,423	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002303648	

(table continues on following page)

Transporters		Ripe fruit receptacles <i>Up regulated</i>						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
gene30855	sugar transport protein	5,445	4,94E-04	5442,932	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_116436.5	
gene26473	tamba black multidrug resistance pump	11,881	8,29E-04	735,659	<i>Glycine max</i>	2E-162	JN316209	
<b>CLUSTER 2</b>								
gene00122	ATP-binding cassette transport family protein	9,636	5,87E-04	6973,567	<i>Populus trichocarpa</i>	0	XM_006383944	
gene08245	bidirectional sugar transporter SWEET1	2,114	4,60E-03	4009,868	<i>Glycine max</i>	6E-47	XP_003523404	
gene00933	bidirectional sugar transporter SWEET1	2,231	1,28E-03	17114,828	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-115	NM_101997	
gene13437	clathrin adaptor complex small chain family protein	2,931	1,34E-03	3372,606	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-68	XM_002308250	
gene08088	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 family protein	3,618	3,71E-03	1753,256	<i>Populus trichocarpa</i>	4E-169	XM_002307607	
gene08792	sulfite exporter TauE/SafE family protein	2,347	2,20E-03	1576,552	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6E-142	NM_179737	
<b>CLUSTER 3</b>								
gene25969	ABC transporter	8,52	4,64E-04	1994,979	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_114646	
gene04460	amino acid transporter	11,36	5,08E-04	4799,353	<i>Populus trichocarpa</i>	7E-171	XM_002323825	
gene23188	anion-transporting ATPase family protein	3,105	2,58E-03	1144,99	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	XM_002882617	
gene19956	cationic amino acid transporter	31,32	6,09E-04	1231,89	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002303678	
gene06067	cyclic nucleotide-gated ion channel	20,58	1,57E-04	1195,681	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-45	NM_124692	
gene28763	glutathione S-transferase	13,18	1,04E-03	3014,172	<i>Pyrus communis</i>	3E-123	DQ901400	
gene21219	glycerol-3-phosphate transporter	3,432	1,01E-03	7107,59	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003534317	
gene09638	importin	2,698	4,24E-03	910,19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_120385	
gene11065	importin	3,093	8,26E-04	2640,33	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003532937	
gene15073	MATE efflux family protein	12,18	3,85E-04	3120,928	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_103646	
gene03636	MATE efflux family protein	8,41	5,19E-03	2051,198	<i>Arabidopsis lyrata</i>	2E-91	XM_002890044	

(table continues on following page)

Transporters		Ripe fruit receptacles <i>Up regulated</i>						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
gene03634	MATE efflux family protein	41,62	2,05E-03	808,352	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XP_002280212	
gene18485	metal tolerance protein	6,48	1,01E-03	6562,629	<i>Glycine max</i>	0.0	XP_003532918	
gene11300	mitochondrial inner membrane translocase	4,46	3,95E-02	1904,287	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-69	AY463970	
gene06443	mitochondrial phosphate transporter	4,82	8,58E-04	746,01	<i>Zea mays</i>	2E-160	NM_001111372	
gene27784	mitochondrial substrate carrier family protein	6,79	7,55E-04	1874,232	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-77	NM_148200.5	
gene14598	oligopeptide transporter	7,43	4,25E-04	1786,545	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002303648	
gene18781	organic anion transporter	2,802	1,94E-03	1423,83	<i>Arabidopsis lyrata</i>	9E-159	XM_002884794	
gene08357	pleiotropic drug resistance protein	9,61	4,40E-04	1072,145	<i>Populus trichocarpa</i>	3E-91	XM_002298087	
gene10072	potassium channel tetramerization domain-containing protein	2,861	1,08E-03	929,08	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	XM_002878690	
gene15923	solute carrier	37,09	3,82E-04	12576,247	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003596504	
gene05814	sugar transporter	6,87	6,18E-04	1700,711	<i>Ricinus communis</i>	0E+00	XP_002517216	
gene12037	TRANSPARENT TESTA 12	13,72	3,82E-04	1327,47	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009373462	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene23477	ABC transporter	5,175	5,73E-03	1454,141	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_001204044	
gene02466	ABC transporter A family member 1	2,524	1,53E-03	1072,99	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008244242	
gene28000	amino acid transporter	4,427	1,65E-03	3619,209	<i>Populus trichocarpa</i>	7E-173	XM_002311042	
gene10994	cation/H(+) antiporter	3,342	6,15E-04	1139,307	<i>Solanum lycopersicum</i>	0	XM_004245503	
gene24391	copper transporter	4,253	1,84E-02	998,343	<i>Vitis vinifera</i>	1E-39	HQ108189	
gene24391	copper transporter	4,253	1,84E-02	998,343	<i>Vitis vinifera</i>	1E-39	HQ108189	
gene11125	CrcB protein	3,352	5,75E-04	2246,614	<i>Medicago truncatula</i>	1E-117	XM_003601034	
gene01202	glutathione S-transferase	2,656	1,50E-03	5403,135	<i>Vitis vinifera</i>	4E-102	XM_002263350	
gene08766	glutathione S-transferase	2,654	4,75E-04	11405,731	<i>Vitis vinifera</i>	1E-70	XM_002275399	

(table continues on following page)

Transporters		Ripe fruit receptacles <i>Up regulated</i>						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 4</b>								
gene12262	glutathione-s-transferase	2,649	1,09E-03	5785,333	<i>Ricinus communis</i>	7E-114	XM_002525018	
gene31672	glutathione S-transferase	1226,608	5,20E-05	27385,948	<i>Malus x domestica</i>	1E-114	JN573600	
gene13420	magnesium transporter	2,535	4,86E-04	911,56	<i>Vitis vinifera</i>	5E-43	XM_002282109	
gene24796	maltose transporter	2,532	2,01E-03	1869,195	<i>Malus x domestica</i>	8E-171	DQ648082	
gene06384	metal transporter	2,525	2,58E-03	1542,737	<i>Medicago truncatula</i>	1E-25	XM_003608272	
gene17615	nucleoprotein TPR	2,372	1,05E-03	1113,076	<i>Ricinus communis</i>	0.0	XM_002518775	
gene12355	peroxisomal membrane ABC transporter family	2,001	1,13E-03	3820,646	<i>Theobroma cacao</i>	0.0	XM_007047913	
gene01833	RAE1 protein	9,954	2,83E-04	3031,32	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_106715	
gene18545	RAE1 protein	56,546	1,46E-03	4379,698	<i>Glycine max</i>	2E-155	NM_001255101	
gene01868	solute carrier family	2,228	2,52E-03	1747,197	<i>Vitis vinifera</i>	5E-179	XM_002271889	
gene06304	sucrose transporter	2,212	8,77E-04	1347,417	<i>Fragaria x ananassa</i>	3E-05	JX013937	Jia, H. 2013
gene18771	translocon at the outer membrane of chloroplasts	2,167	2,36E-02	920,235	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_112678	
gene31711	vacuolar amino acid transporter	2,025	5,72E-04	6382,371	<i>Vitis vinifera</i>	3E-148	XM_002270872	
gene16819	vacuolar ATP synthase subunit F	2,022	1,60E-03	8532,878	<i>Zea mays</i>	9E-71	NM_001156371	

Primary and secondary metabolism

In relation to primary and secondary metabolism and considering those genes potentially more involved in the receptacle fruit ripening we can find genes that encode several 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases whose expression is fruit specific and very high in red-ripen receptacles are included in Cluster 1R (*gene23979* and *gene31924*) or Cluster 3R (*gene11730* and *gene31923*) (Table 10; Additional files, Chapter 2, Additional table 23). None of the putative orthologous dioxygenases have been characterized, but its expression patterns clearly suggest that these may be involved in important metabolic pathways that are specific to the ripening process. The physiological function of these enzymes should be established through reverse genetics functional experiments. Interestingly, three genes (*gene23438*, *gene19242* and *gene18910*) that are located in Cluster 1R, encode 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolases. These three genes present an expression pattern fruit receptacle-specific and with a high amount of transcript in ripe receptacles (Table 10; Additional files, Chapter 2, Additional table 23). In mammals, the 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolases are involved branched chain amino acid catabolism. However, in plants, the functional characterization of these enzymes is very scarce. In *Arabidopsis*, the mutant *chy1* that is disrupted in gene *CHY1*, that encodes a 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, presents a blockage in peroxisomal valine catabolism giving rise to an alteration of the peroxisomal beta-oxidation (Lange *et al.*, 2004). More recently, it has been showed that the *chy* mutant in *A. thaliana* presents a deficiency of benzoic acid-containing glucosinolates in the seeds (Ibdah and Pichersky, 2009). The expression pattern shared between these 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolases and some 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases and a monooxygenase (*gene21507*), which can be potentially involved in glucosynolate metabolism (Zhang *et al.*, 2015), could suggest an active production of these compounds along the receptacle fruit ripening.

Also, another component of Cluster 1R is *gene24860* that putatively encodes a trehalose-phosphate synthase an enzyme that catalyzes the production of trehalose 6-phosphate (T6P) from glucose glucose-6-phosphate and UDP-glucose, derived from sucrose. It has now been well established that T6P acts as a sensor of sucrose concentration which regulates the activity of a protein kinase SnRK1 so stimulating growth de-repressing the expression of many different anabolic genes (Lawlor and Paul, 2014). Otherwise, the amount of T6P increases substantially with the content of sucrose or with the increment of sucrose flux to sink organs as fruits (Lawlor and Paul, 2014). Along the strawberry fruit ripening, an increase in the concentration of sucrose, glucose and fructose it has been reported (Fait *et al.*, 2008). This result suggests that T6P could play an important regulatory role of many metabolic pathways that are specific from ripe fruit

receptacles and that can be influenced by the endogenous production of ABA. It should be important the elucidation of the physiological role that this gene plays in the ripening process.

Acetolactate synthase (ALS) is an enzyme that catalyzes the first step in the synthesis of the branched-chain amino acids (valine, leucine, and isoleucine). The expression of two genes, that encode putative ALS small regulatory subunit, is up-regulated in ripe receptacles (*gene29713* and *gene21929*) and belong to Cluster 1R (Table 10; Additional files, Chapter 2, Additional table 23). These genes could be involved in the production of compounds that are components of the fruit aroma. Other genes have previously been functionally characterized as aroma-related genes, also belong to Cluster 1R.

S-adenosylmethionine synthetase is the enzyme that catalyses the formation of S-adenosylmethionine, that in turn is used as a substrate for the O-methylation of many secondary metabolites of plants as pectins, phenylpropanoids, flavonoids, lipids, proteins, polysaccharides, polynucleotides, etc. This methylation is fundamental to a large number of important biological functions (Mata, 2007; Huguency *et al.*, 2009). In our transcriptomic study, we have detected several genes encoding both types of enzymes (Table 10; Additional files, Chapter 2, Additional table 23), indicating that O-methylation process of many metabolites, as for instance flavonoids and phenylpropanoids, is important in ripe fruits.

To sum up, this transcriptomic work strongly support the proposal of Perkins-Veazie (1985) which suggested that the ratio auxins/ABA is the main regulatory signal that determine the interface between growth and ripening stages of strawberry fruit maturation. Thus, auxins would control the main molecular and biochemical pathways engaged in receptacle growth while ABA would regulate all stages of ripening. However, it cannot be ruled out that others hormonal or physiological signals, not yet elucidated, can influence some aspects of the strawberry fruit growth and ripening process.

Table 10. Manual annotation of differentially regulated genes involved in primary and secondary metabolism sorted into the four R-up clusters. Magnitudes of relative induction to ripe receptacles, p-value ( $\leq 0.05$ ) and arbitrary units of intensity (a.u.i.) are given. Intensity in blue scale (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID in purple indicates specificity of expression in ripe receptacle against to vegetative tissues. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Additional files; Chapter 2; Additional file 1.

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>PRIMARY METABOLISM</b>								
gene04580	6-phosphogluconolactonase	16,628	5,05E-04	2574,234	<i>Glycine max</i>	3E-138	XM_003516359	
gene05994	D-glycerate 3-kinase	7,443	4,75E-04	12504,224	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-175	NM_179581	
gene26175	enolase	2,865	1,16E-03	772,089	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002274298	
gene25718	hexokinase	3,159	1,12E-03	1131,712	<i>Eriobotrya japonica</i>	0.0	JF414121	
gene22813	pyruvate dehydrogenase	4,017	5,89E-04	8536,978	<i>Glycine max</i>	6E-175	XM_003533767	
gene13140	pyruvate kinase	2,259	4,20E-03	6096,448	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_124670	
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene27452	2-nitropropane dioxygenase	13,142	3,79E-04	8335,241	<i>Solanum lycopersicum</i>	5E-113	XM_004230521	
gene09899	2-nitropropane dioxygenase	12,848	4,74E-04	9265,162	<i>Arabidopsis lyrata</i>	2E-156	XM_002866557	
gene16498	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	6,495	6,96E-04	801,75	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-34	XM_002309556	
gene01062	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	5,862	1,49E-03	1233,291	<i>Populus trichocarpa</i>	6E-105	XM_002324800	
gene23979	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	7,136	4,41E-04	66835,624	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-98	XM_002298091	
gene31924	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	61,726	4,41E-04	4279,458	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002330233	
gene03646	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	5,751	4,69E-04	15418,07	<i>Medicago truncatula</i>	1E-128	XM_003620308	
gene23438	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	4,742	5,72E-04	4718,315	<i>Vitis vinifera</i>	1E-144	XM_002264706	

(table continues on following page)

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene19242	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	17,182	3,78E-04	54892,377	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8E-127	NM_128618	
gene18910	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	125,628	1,03E-03	14135,73	<i>Arabidopsis lyrata</i>	5E-111	XM_002865047	
gene29713	Acetolactate synthase small subunit	4,588	1,18E-03	5118,796	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003629897	
gene21929	Acetolactate synthase small subunit	4,555	2,04E-03	2645,553	<i>Nicotiana glauca</i>	2E-42	AJ234901	
gene26121	Adenine nucleotide alpha hydrolases	34,36	4,11E-04	2911,479	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-39	NM_111199	
gene00616	aldo-keto reductase	8,169	5,45E-04	63827,81	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AF039182	Agius, F. 2003
gene16551	aldo-keto reductase	88,176	3,66E-04	27282,14	<i>Cicer arietinum</i>	8E-154	XM_004494635	
gene22147	aldo-keto reductase	14,878	3,91E-04	200929,78	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	AY703448	Almeida, JR. 2007
gene19737	Alternative oxidase 4	4,583	2,08E-03	2842,268	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-139	NM_118352	
gene01893	Aminoacrylate hydrolase	48,071	4,03E-04	6923,693	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002279862	
gene08027	Ankyrin repeat domain-containing protein	2,792	1,59E-03	2574,489	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003624606	
gene12578	ATPase family AAA domain-containing protein	3,713	3,42E-03	1102,949	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002274041	
gene22433	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit	3,793	8,02E-04	780,564	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003556532	
gene11229	Beta-galactosidase	49,103	5,32E-04	9441,474	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003630403	
gene20643	Beta-glucosidase	77,276	4,64E-04	4636,072	<i>Lotus japonicus</i>	1E-143	EU710846	
gene28508	CXE carboxylesterase	47,098	4,65E-04	13047,412	<i>Malus pumila</i>	3E-141	DQ279907	
gene22484	cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase	6,68	8,23E-04	1799,053	<i>Mirabilis jalapa</i>	2E-148	AB182643	
gene03985	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,266	1,41E-03	3816,298	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-57	NM_102458	
gene16488	cytidine/deoxycytidylate deaminase	4,703	2,65E-03	3792,767	<i>Zea mays</i>	2E-92	EU974505	
gene28822	cytochrome c oxidase subunit VIb	2,863	1,95E-03	4691,212	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-41	NM_125166	
gene07324	cytochrome P450	64,066	5,49E-04	2846,156	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-59	XM_002299543	
gene07016	cytochrome P450	8,67	1,04E-03	4727,742	<i>Citrus sinensis</i>	2E-78	AF426451	

(table continues on following page)



Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene34199	cytochrome P450	15,193	3,78E-04	2049,247	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8E-45	NM_148854	
gene27856	dienelactone hydrolase	7,079	6,48E-04	1722,855	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-42	NM_113263	
gene05154	dihydrolipoyl dehydrogenase	2,233	2,31E-03	1849,618	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002276817	
gene17835	distachyon 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase	7,659	1,70E-03	1036,006	<i>Brachypodium distachyon</i>	6E-82	XM_003581183	
gene17836	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase	6,921	1,69E-03	1110,972	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-72	NM_120614	
gene09927	ferric reduction oxidase	8,354	4,73E-04	1293,24	<i>Malus domestica</i>	0.0	XP_008373357	
gene32455	glutathione peroxidase	5,496	5,26E-04	13073,956	<i>Pistia stratiotes</i>	8E-13	EF620783	
gene08940	glycogenin domain-containing protein	207,743	8,21E-04	1047,09	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003608665	
gene32694	glycogenin-like starch initiation protein	2,206	1,34E-03	3517,21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_106363	
gene24141	histidinol phosphate phosphatase	2,728	1,49E-03	1421,08	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008237177	
gene31205	histidyl-tRNA synthetase	6,326	7,86E-04	8138,59	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_111144.5	
gene30876	inorganic pyrophosphatase	3,98	1,87E-03	4898,77	<i>Glycine max</i>	4E-86	XM_003531579	
gene11912	Isoamylase	6,333	1,11E-03	10679,243	<i>Solanum tuberosum</i>	0.0	AY132998	
gene27838	Isomerase	5,105	5,29E-04	1430,92	<i>Medicago truncatula</i>	9E-117	XM_003590624	
gene16656	L-allo-threonine aldolase	10,403	4,94E-04	24302,978	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003521724	
gene28414	L-aspartate oxidase	66,513	4,33E-04	1810,436	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_121480	
gene12969	lysine-ketoglutarate reductase	6,519	4,33E-04	16450,421	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0	AF264147	
gene10008	methionine sulfoxide reductase	7,247	6,20E-04	51846,022	<i>Fragaria x ananassa</i>	2E-116	Z69596	
gene21507	monooxygenase	191,25	6,55E-04	2535,825	<i>Arabidopsis lyrata</i>	4E-90	XM_002868137	
gene21033	multiple inositol polyphosphate phosphatase	3,135	7,64E-04	4347,381	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003600923	
gene30707	NAD(P)H dehydrogenase B2	17,292	3,83E-04	16333,61	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_116741	
gene14267	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	3,061	1,57E-03	1552,909	<i>Solanum tuberosum</i>	7E-78	AB061251	

(table continues on following page)

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene09003	NADP-dependent malic enzyme	11,371	6,84E-04	5967,093	<i>Bean (P.vulgaris)</i>	0.0	J03825	
gene02228	oxysterol-binding family protein	4	1,37E-03	961,383	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002283398	
gene11108	oxysterol-binding family protein	2,462	9,77E-04	1206,215	<i>Arabidopsis lyrata</i>	0.0	XM_002872324	
gene08702	plasma membrane H+ ATPase	4,323	7,65E-04	27517,153	<i>Prunus persica</i>	0.0	AJ271438	
gene12064	pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	7,624	1,63E-03	2502,027	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.0	XM_004236102	
gene00649	quinone oxidoreductase	4,465	9,97E-04	1945,12	<i>Glycine max</i>	3E-29	XM_003531961	
gene27475	quinone oxidoreductase	13,233	5,39E-04	16050,211	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003526736	
gene21391	quinone oxidoreductase	5,816	4,69E-04	29626,026	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-151	AK221446	
gene18229	retinol dehydrogenase-like protein	22,715	3,80E-04	3363,27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9E-146	NM_120332	
gene06906	ripening-related P-450 monooxygenase	137,527	1,97E-03	2250,611	<i>Medicago truncatula</i>	1E-69	XM_003589612	
gene19545	RNA (guanine-9-)-methyltransferase domain-containing protein	7,433	2,11E-03	754,642	<i>Medicago truncatula</i>	3E-105	XM_003594254	
gene09668	S-adenosylmethionine synthetase	5,368	7,16E-04	10902,728	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003625634	
gene19647	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	35,764	3,98E-04	9817,183	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-91	NM_129701	
gene19469	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	36,527	6,24E-04	5063,202	<i>Medicago truncatula</i>	3E-107	XM_003624980	
gene12180	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	11,05	4,00E-04	16487,483	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7E-105	NM_121121	
gene30813	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	6,439	6,13E-04	2258,405	<i>Zea mays</i>	3E-136	EU955451	
gene12002	serine carboxypeptidase protein	9,123	1,05E-03	1357,057	<i>Pisum sativum</i>	0.0	AJ251970	
gene26251	S-methyl-5-thioribose kinase	2,287	5,15E-03	1221,528	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_103869	
gene22780	SNF5-type chromatin-remodeling complex protein	3,963	5,73E-04	921,443	<i>Glycine max</i>	7E-115	HM068618	
gene24860	trehalose-phosphate synthase	26,578	7,73E-04	1318,367	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_106505	
gene09373	U-box domain-containing protein (amidase containing protein)	2,154	3,82E-03	1692,36	<i>Vitis vinifera</i>	0.0	XM_002272055	

(table continues on following page)

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 1</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene20126	UDP-arabinose 4-epimerase	2,105	3,20E-03	2407,508	<i>Glycine max</i>	0.0	XM_003524972	
gene32119	UDP-glucose 4-epimerase	2,771	2,83E-03	986,206	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003610933	
gene16762	UDP-glucose:sterol 3-O-glucosyltransferase	12,073	4,83E-04	862,102	<i>Withania somnifera</i>	0.0	EU342378	
gene07097	uncharacterized(NADH-ubiquinone reductase complex 1 MLRQ subunit)	10,098	3,90E-04	8473,24	<i>Morus notabilis</i>	4E-44	XP_010100274	
gene21168	WD-repeat protein	12,423	1,98E-03	1747,342	<i>Ricinus communis</i>	0.0	XM_002510961	
gene04078	Xylose isomerase	4,999	7,00E-04	1760,383	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003610131	
<b>CLUSTER 2</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene21964	bifunctional monodehydroascorbate reductase and carbonic anhydrase	2,913	1,68E-03	4567,83	<i>Malus domestica</i>	3E-144	XP_008351630	
gene17534	CXE carboxylesterase	15,428	3,80E-04	4299,122	<i>Malus pumila</i>	1E-112	DQ279909	
gene06716	cytochrome P450	45,817	7,31E-05	3399,351	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002319738	
gene24970	mannitol dehydrogenase	2,525	1,86E-03	4289,28	<i>Medicago truncatula</i>	1E-174	XM_003612930	
gene03258	quinone reductase	2,26	1,28E-03	9598,769	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	2E-119	XM_002867470	
<b>CLUSTER 3</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene20258	2-isopropylmalate synthase	2,449	3,45E-03	937,24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-69	NM_106063	
gene31922	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	18,23	1,63E-03	2129,666	<i>Populus trichocarpa</i>	7E-168	XP_002330269	
gene11730	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	14,39	7,39E-04	1624,766	<i>Populus trichocarpa</i>	1E-61	XM_002298093	
gene31923	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase	32,47	3,83E-04	12119,73	<i>Populus trichocarpa</i>	4E-169	XM_002330233	
gene17851	4,5-DOPA dioxygenase extradiol protein	2,848	2,59E-03	17161,69	<i>Medicago truncatula</i>	2E-124	XM_003619657	
gene19636	adenosine 5'-phosphosulfate reductase	7,41	4,20E-04	7605,394	<i>Glycine max</i>	0.0	AF452450	

(table continues on following page)

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 3</b>								
<b>SECONDARY METABOLISM</b>								
gene28530	carboxylesterase	3,559	9,22E-04	1161,15	<i>Malus pumila</i>	2E-149	DQ279906	
gene19490	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	4,70	1,31E-03	733,325	<i>Theobroma cacao</i>	0.0	EOY28772	
gene06729	cytochrome P450	355,48	1,90E-03	2966,733	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002307093	
gene07140	cytochrome P450	57,82	3,83E-04	3211,294	<i>Populus trichocarpa</i>	2E-84	XM_002303510	
gene09988	cytochrome P450	35,50	7,16E-04	726,525	<i>Nicotiana tabacum</i>	6E-156	GU590869	
gene29956	cytochrome P450	8,78	1,10E-03	1495,191	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002315974	
gene17572	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide	3,078	1,13E-03	1931,15	<i>Arabidopsis thalian</i>	3E-44	NM_103710	
gene14886	esterase-lypase domain containing protein	2,386	1,47E-03	2904,33	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008241785	
gene28497	glucose and ribitol dehydrogenase	12,71	5,16E-04	772,58	<i>Medicago truncatula</i>	9E-45	XP_003591094	
gene02043	molybdopterin biosynthesis protein	6,17	2,44E-04	2398,752	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-125	NM_001202723	
gene17390	monocopper oxidase	2,783	1,37E-03	2557,98	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009358973	
gene00617	non-functional NADPH-dependent codeinone reductase 2-like	41,70	4,22E-04	5519,18	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	1E-171	XP_009351796	
gene14916	oxidoreductase N-terminal domain containing protein	3,419	1,17E-03	5612,41	<i>Medicago truncatula</i>	0.0	XM_003621562	
gene26275	phosphoglycerate dehydrogenase	4,72	7,52E-03	4746,82	<i>Gossypium hirsutum</i>	0.0	FJ415190	
gene09966	quinolinate synthase	17,57	8,35E-04	2923,164	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_124400	
gene32447	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	22,70	5,81E-04	1286,25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-95	NM_121121	
gene16110	senescence-associated carboxylesterase 101 isoform X2	4,00	1,10E-03	2.340,20	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008227530	
<b>CLUSTER 4</b>								
gene10140	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	3,169	3,83E-03	760,79	<i>Malus domestica</i>	0.0	XP_008383990	
gene06823	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	8,17	1,52E-03	990,485	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4E-138	NM_101878	
gene07049	Acyl-CoA dehydrogenase domain containing protein	2,551	1,22E-03	909,16	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009352311	
gene30068	alcohol dehydrogenase	2,64	2,24E-03	10890,92	<i>Rosa rugosa</i>	0.0	AHD24944	

(table continues on following page)

Primary and Secondary Metabolism		Ripe fruit receptacles Up regulated						
GENES	Putative function	Fold	p-value	a.u.i.	closer homologs in other plant specie	e-value	Best Match BlastX	Reference
<b>CLUSTER 4</b>								
gene13960	aldo-keto reductase	4,43	6,04E-04	819,10	<i>Cucumis sativus</i>	4E-142	XM_004140350	
gene34982	aldo-keto reductase 1 isoform X1	4,689	3,39E-03	3963,77	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008218253	
gene27413	beta-ureidopropionase	3,218	1,17E-03	23434,35	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009368303	
gene33290	beta-ureidopropionase	3,499	1,14E-03	16455,963	<i>Vitis vinifera</i>	0	XM_002268277	
gene12400	bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase	2,353	1,32E-03	6762,14	<i>Prunus mume</i>	0.0	XP_008237950	
gene12401	bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase	2,316	5,69E-04	7301,02	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	0.0	XP_009366842	
gene08033	cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase	3,567	3,46E-03	3544,80	<i>Fragaria x ananassa</i>	0.0	ABW38332	
gene10225	dihydrofolate reductase	3,416	7,60E-04	18652,533	<i>Glycine max</i>	2E-115	XM_003554028	
gene27225	glutamine amidotransferase (GATase1)-like	2,578	1,25E-03	1143,48	<i>Malus domestica</i>	0.0	XP_008350011	
gene31672	glutathione S-transferase	1226,61	5,20E-05	27385,95	<i>Malus x domestica</i>	1E-114	JN573600	
gene22014	glutathione S-transferase	3	3,42E-02	1377,74	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	6E-123	XP_009365718	
gene25602	Isocitrate dehydrogenase	2,573	1,57E-03	7956,769	<i>Medicago truncatula</i>	0	XM_003618131	
gene13709	monodehydroascorbate reductase	2,492	2,41E-03	23782,809	<i>Malus x domestica</i>	0.0	FJ752239	
gene11100	monodehydroascorbate reductase	2,487	1,90E-03	1116,262	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_113698	
gene01456	phenylacetaldehyde reductase	2,347	3,57E-03	5706,181	<i>Rosa x damascena</i>	1E-159	AB426519	
gene14712	phenylacetaldehyde reductase	2,564	2,16E-03	714,13	<i>Rosa x damascena</i>	0.0	XM_002530324	
gene22089	phosphoglycerate mutase protein	4,009	7,99E-03	1573,448	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-101	NM_102067	
gene17051	probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	2,33	4,52E-03	777,38	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	1E-156	XP_009345225	
gene08799	protein PEROXIN-4	2,219	1,48E-03	23217,95	<i>Cucumis melo</i>	2E-111	XP_008445030	
gene34103	pyridoxal kinase	2,284	1,66E-03	3636,73	<i>Vitis vinifera</i>	3E-92	XM_002271457	
gene17266	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing protein	2,246	1,23E-03	1658,38	<i>Ricinus communis</i>	4E-112	XM_002533353	
gene08633	UDP-sugar pyrophosphorylase	2,151	7,79E-03	959,751	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.0	NM_124635	

## **CHAPTER 3**

### **An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles**

This chapter has been published as:

**Medina-Puche L**, Molina-Hidalgo FJ, Boersma MR, 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.

Footnote:

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaEOBII* (KM099230).

**CHAPTER 3****An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles****Abstract**

Eugenol is a volatile phenylpropanoid that contributes to flower and ripe fruit scent. In ripe strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit receptacles, eugenol is biosynthesized by eugenol synthase (*FaEGS2*). However, the transcriptional regulation of this process is still unknown. We have identified and functionally characterized a R2R3 MYB transcription factor (*EMISSION OF BENZENOID II [FaEOBII]*) that seems to be the orthologous gene of *PhEOBII* from *Petunia hybrida* that contributes to the regulation of eugenol biosynthesis in petals. The expression of *FaEOBII* was ripening related and fruit receptacle specific, although high expression values were also found in petals. This expression pattern of *FaEOBII* correlated with eugenol content in both fruit receptacle and petals. The expression of *FaEOBII* was repressed by auxins and activated by abscisic acid (ABA), in parallel to the ripening process. In ripe strawberry receptacles, where the expression of *FaEOBII* was silenced, the expression of *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (FaCAD1)* and *FaEGS2*, two structural genes involved in eugenol production, was down-regulated. A subsequent decrease in eugenol content in ripe receptacles was also observed, confirming the involvement of *FaEOBII* in eugenol metabolism. Additionally, the expression of *FaEOBII* was under control of *FaMYB10*, another R2R3 MYB transcription factor that regulates the early and late biosynthetic genes from the flavonoid/phenylpropanoid pathway. In parallel, the amount of eugenol in *FaMYB10*-silenced receptacles was also diminished. Taken together, all these data indicate that *FaEOBII* plays a regulating role of the volatile phenylpropanoid pathway gene expression that gives rise to eugenol production in ripe strawberry receptacles.

**Introduction**

The octoploid cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) is one of the most economically important, non-climacteric, soft fruits in which volatile compounds influence fruit flavour and aroma. Both characteristics contribute to the fruit organoleptic traits and are crucial factors to determine fruit quality.



At present, extensive surveys on the components that contribute to strawberry flavour have been performed. In these studies, more than 360 volatiles have been identified (Latrasse, 1991; Nijssen, 1996; Zabetakis and Holden, 1997), but only 15–20 of them in wild varieties of strawberry are believed to be essential for sensory quality, together with non-volatile sugars and organic acids (Schieberle and Hofmann, 1997). In contrast, in cultivated varieties of strawberry, only about 6 odour-active compounds have been identified as contributors to fruit flavour (Raab *et al.*, 2006; Ulrich *et al.*, 2007). Strawberry aroma is the result of the combined perception of fruity (ethyl butanoate, ethyl hexanoate, and methyl 2-methylbutanoate), green (*Z*-3-hexenal), sweaty (butanoic acid and 2-methylbutanoic acid), peach-like ( $\gamma$ -decalactone), and caramel-like [4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF; Furaneol) and 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (DMMF)] flavour notes (Pyysalo *et al.*, 1979; Larsen and Poll, 1992). Several wild strawberry studies have identified that some of the key components of strawberry flavour, including acetates of hydroxycinnamoyl alcohols and phenylpropenes, such as eugenol and isoeugenol, which are phenylpropanoid derivatives (Pyysalo *et al.*, 1979; Ulrich *et al.*, 1995, 2007). These volatile compounds, together with volatile benzenoid, such as phenylacetaldehyde, phenylethylalcohol, benzaldehyde, benzyl alcohol, benzyl benzoate, methyl benzoate, benzylacetate, methyl salicylate, or vanillin, are also floral scent components (Schuurink *et al.*, 2006).

To date, few transcription factors (TFs) that regulate the expression of the volatile benzenoid/phenylpropanoid pathway structural genes have been identified. In petunia (*Petunia hybrida*), the function of EMISSION OF BENZENOID II (PhEOBII) and ODORANT 1 (ODO1), two R2R3-MYB TFs, have been described as regulators of the volatile and non-volatile phenylpropanoid biosynthesis pathway (Verdonk *et al.*, 2005; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). PhEOBII binds and activates the promoter of *ODO1* through the union to MYB-binding-site (MBS) indicating a hierarchical link between both TFs (Van Moerkercke *et al.*, 2011). Previous works carried out on protoplast extracted from Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) leaves showed binding of PhEOBII to the petunia *ISOEUGENOL SYNTHASE (IGS)* and to the tobacco (*Nicotiana tabacum*) Phe ammonia lyase B (*PALB*) promoters (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Reduction of *EOBII* transcript levels in petunia petals by virus-induced gene silencing (VIGS) leads to a down-regulation of the expression of genes involved in shikimate and phenylpropanoid pathways such as *CHORISMATE SYNTHASE (CS)*, *CHORISMATE MUTASE (CM)*, *PHENYLALANINE AMMONIALYASE (PAL2)*, *CONIFERYL ALCOHOL ACETYLTRANSFERASE (CFAT)*, *ISOEUGENOL SYNTHASE (IGS)*, *BENZOYL-COA:BENZYL ALCOHOL/PHENYLETHANOL BENZOYLTRANSFERASE (BPBT)* and *ODO1*, whereas no changes were detected in the expression levels of *CHALCONE ISOMERASE (CHI)* or

*FLAVANONE 3-HYDROXYLASE (FHT)*. However, overexpression of *EOBII* did not produce an increase in the expression levels of *ODO1*, *BPBT*, *CS*, *CM* and *FHT*. This could suggest that these genes could be regulated by the synergistic action of *EOBII* and other TF. On the other hand, *PAL*, *CFAT* and *IGS* transcripts were up-regulated, indicating a direct positive regulation role of the expression of these genes by *EOBII* (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Besides, *ODO1* was demonstrated to activate the promoter of *5-ENOL-PYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE (EPSPS)* gene, hence regulating the floral shikimate pathway that produces benzenoid/ phenylpropanoid volatiles (Verdonk *et al.*, 2005). Additionally, *ODO1* silencing resulted in a severe decrease of volatile production in petunia flowers, such as phenylacetaldehyde, phenylethylalcohol, methyl benzoate, benzyl acetate, benzyl benzoate, vanillin and isoeugenol, but it did not affect production of Phe-derived flavonols and anthocyanins (Verdonk *et al.*, 2005). Ectopic expression of *PhODO1* in tomato (*Solanum lycopersicum*) increased expression of only a subset of phenylpropanoid-associated genes. Changes in expression of genes related to flavonoid synthesis were not detected in transgenic fruits. These data were consistent with the metabolomic changes observed (Dal Cin *et al.*, 2011).

Recently, a third transcription factor (*EOBI*) has been identified in petunia as a regulator of floral scent production through direct modulation of the expression of *ODO1* and structural scent-related genes. *EOBI* is a R2R3-MYB TF that is required for proper expression of structural and regulatory genes related to floral phenylpropanoid scent production (Spitzer-Rimon *et al.*, 2012). *EOBI* silencing down-regulated several genes from shikimate and phenylpropanoid pathway (i.e., *EPSPS*, *CS*, *CM*, *PAL*, *IGS*, *EGS* and *ODO1* among others), which clearly led to reduced levels of floral volatiles, such as benzylbenzoate, phenylethylbenzoate, benzyl alcohol, methylbenzoate, methylsalicylate, isoeugenol and eugenol (Spitzer-Rimon *et al.*, 2012). However, an *EOBI* orthologous gene has not been detected in strawberry yet.

Eugenol and isoeugenol are volatile compounds produced by plants as floral attractants of pollinators, as well as defence compounds (Koeduka *et al.*, 2006; Pasay *et al.*, 2010). Fruits can also synthesize volatile phenylpropenes that contribute to their aroma (Jordán *et al.*, 2001; Aubert and Pitrat, 2006; Ortiz-Serrano and Gil, 2010). Eugenol production by strawberry ripe fruits has been previously reported (Pyysalo *et al.*, 1979; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). Interestingly, the amount of this volatile is lower in domesticated fruits (*F. ananassa*) than in wild diploid *Fragaria vesca* (Pyysalo *et al.*, 1979). By contrast, isoeugenol biosynthesis in strawberry fruits is extremely low in comparison with eugenol levels (Hoffmann *et al.*, 2011).

The last step of the phenylpropane eugenol biosynthesis is catalysed by the EUGENOL SYNTHASE (EGS), a NADPH-dependent reductase belonging to the PIP family (piroresinol-lariciresinol reductase [PLR], isoflavone reductase [IFR], phenylcoumaran benzylic ether reductase [PCBER]) (Min *et al.*, 2003). To date, only a small number of plant EGS, such as ObEGS1 (from *Ocimum basilicum*) (Koeduka *et al.*, 2006), CbEGS1 and ChbEGS2 (from *Clarkia breweri*) and PhEGS1 (from *Petunia hybrida*) (Koeduka *et al.*, 2008), have been functionally characterized. These enzymes can use coniferyl acetate as a substrate for eugenol *in vitro* production. Overexpression of a coniferyl alcohol acetyltransferase (PhCFAT) and a eugenol synthase (PhEGS) from petunia in aspen increased eugenol production in leaves (Koeduka *et al.*, 2013).

More recently, two different genes (*FaEGS1* and *FaEGS2*) coding two strawberry eugenol synthases have been functionally characterized (Aragüez *et al.*, 2013). *FaEGS1* was predominantly expressed in green achenes, whereas expression of *FaEGS2* was specific to ripe fruit receptacle (Aragüez *et al.*, 2013). The expression pattern of both genes correlated with eugenol content of both achenes and fruit receptacle. *FaEGS1* as well as *FaEGS2* enzymes can use *in vitro* coniferyl acetate as a substrate for eugenol production (Aragüez *et al.*, 2013). Although eugenol production in strawberry fruit has been clarified, the regulation of the volatile benzenoid/phenylpropanoid structural pathway that renders eugenol in strawberry fruit receptacles has not been elucidated.

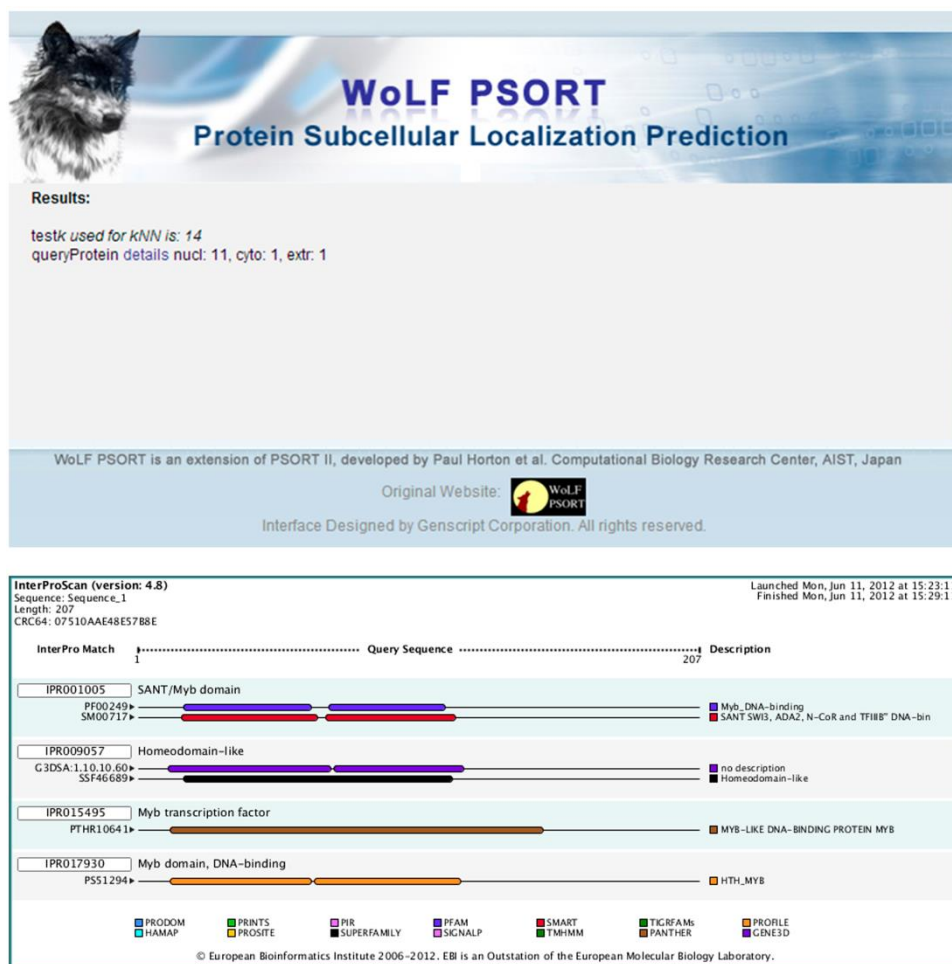
Previously performed transcriptomic studies in our research group allowed us to identify a wide group of genes whose expression increased throughout strawberry fruit ripening. One of these genes, *FaEOBII* (*gene28435*, 46.063 up), showed a significant sequence homology with the R2R3-MYB, such as transcription factor *PhEOBII*. Nevertheless, we have not observed the up-regulation of any orthologous *ODO1* or *EOBI* genes when comparing the transcriptomes of mature red-ripen and immature green receptacles. Although putative orthologous gene of *EOBI* from *Petunia* has not been detected in strawberry genome, putative orthologous genes of *ODO1* from *Petunia* have been identified in strawberry genome (*gene32268*, *gene21264*, *gene12564*, *gene30520*). However, none of them present an expression pattern associated with the ripening process of the strawberry receptacles (*gene21264*, 1.559 down; *gene12564*, 1.468 down; *gene30520*, 1.024 up) but the expression of *gene32268* (*FaODO1*), by both microarray studies (13.875 down) and qRT-PCR method (23.912 down), was down-regulated along ripening process.

In this chapter, we present the functional characterization of the R2R3-MYB TF *FaEOBII* gene whose expression is fruit receptacle-specific and that is related to eugenol production. This regulatory role is executed through the activation of the *FaCAD1* and *FaEGS2* gene expression.

## Results

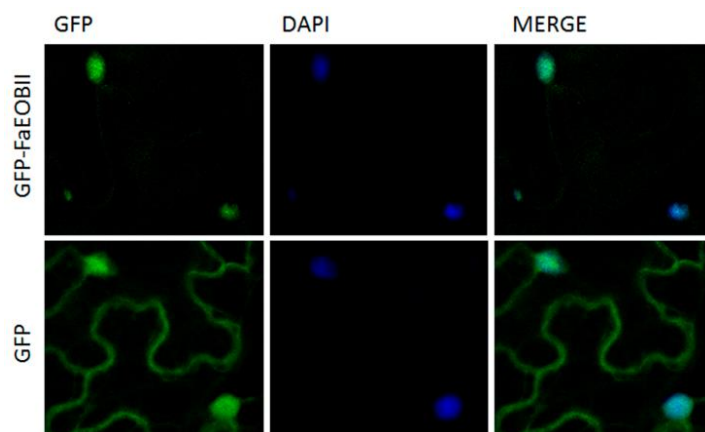
### Sequence analysis of the *FaEOBII* gene and protein

Full-length cDNA sequence of the *FaEOBII* gene contained an open reading frame of 624-bp that encodes a polypeptide of 207 amino acid residues and has a predicted molecular mass of 23.26 KDa. WoLF PSORT predicted the nuclear location of this protein (Figure 1).



**Figure 1:** Screenshots corresponding to the results of prediction of domains and functional sites performed with InterProScan database (version 4.8) ([www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)) and prediction of protein localization sites in cells performed with the WoLF PSORT computer program ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)).

To confirm this hypothesis, we have determined the subcellular location of FaEOBII protein *in vivo*. To that end, an N-terminal translational fusion protein construct between FaEOBII and GFP protein was transiently expressed under the control of CaMV 35S promoter in *N. benthamiana* leaves. As expected, confocal imaging of the fusion protein revealed co-location with nucleus marker DAPI in the parenchyma cells of the abaxial epidermis of tobacco leaves, thus confirming nuclear location of FaEOBII protein (Figure 2).

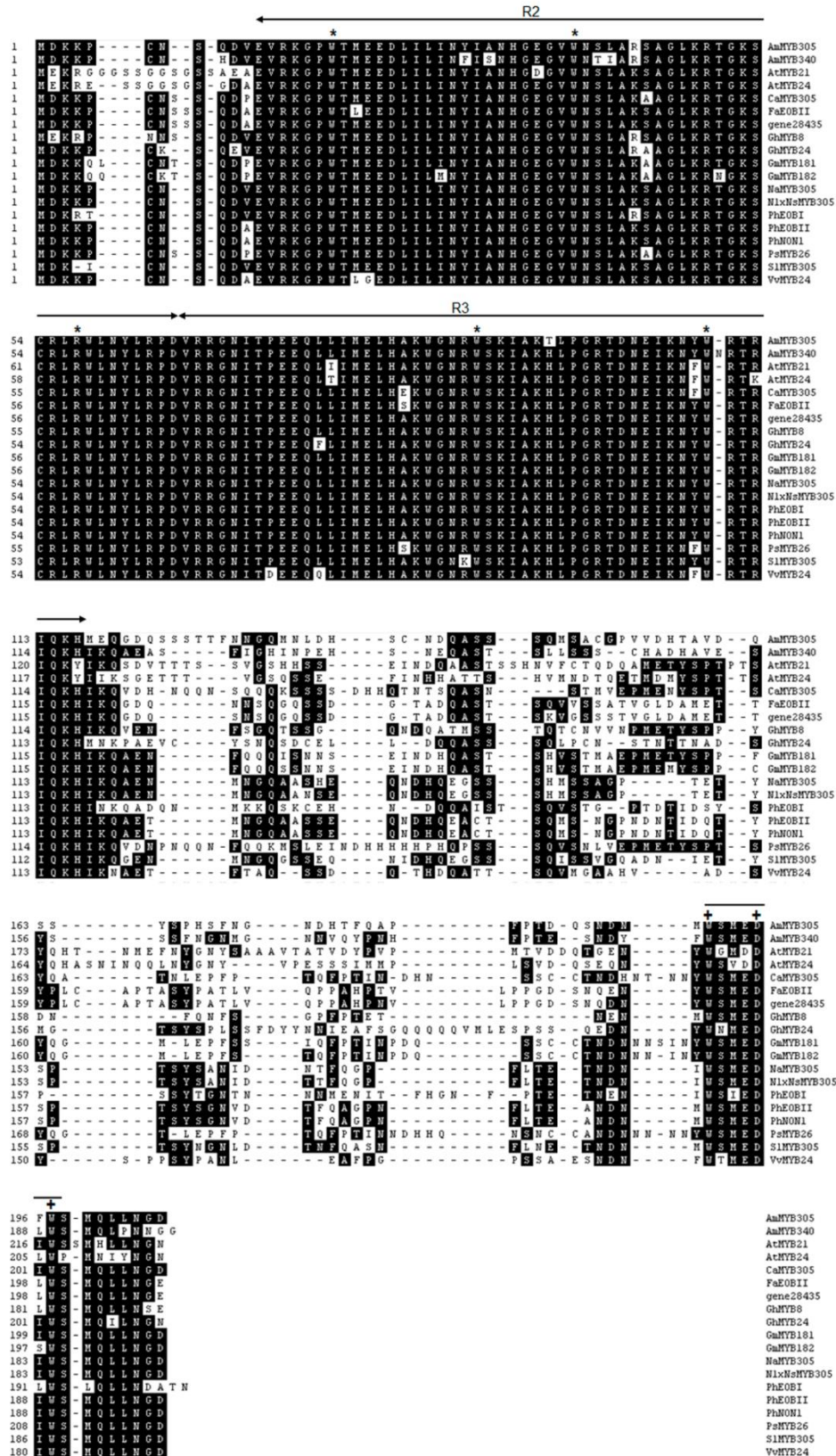


**Figure 2:** Nuclear location of FaEOBII protein in plant cells. Fluorescence signal detected using a confocal microscope from GFP-FaEOBII (upper) and GFP (lower) expression under the 35S promoter in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermis cells; GFP, green fluorescent protein; DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole; MERGE, merged view of the GFP and DAPI images.

The analysis of the predicted FaEOBII protein revealed the R2 and R3 repeats signatures at its amino terminus that are characteristic of the R2R3 DNA-binding MYB proteins (Kranz *et al.*, 1998) (Figure 1), which are important for interaction with regulatory sequences in promoters (Kranz *et al.*, 1998; Dubos *et al.*, 2010). We also identified a W/Y-MDDIW transactivation motif (Li *et al.*, 2006) at its carboxyl terminus, with three particular amino acids (Trp-193, Asp-197, and Trp-199) conserved in all the sequences analysed (Figure 3).

Based on these features outside the DNA binding R2R3 domain, FaEOBII can be classified into subgroup 19 of the R2R3-MYB transcription factors (Figure 4; Dubos *et al.*, 2010; Additional files; Chapter 3; Additional table 1; Additional table 2). Phylogenetically, FaEOBII shares high amino acid homology with members of this subgroup of MYB TFs from other plants, such as PsMYB26 (*Pisum sativum*), NlxNsMYB305 (*Nicotiana langsdorffii* × *Nicotiana sanderae*), AmMYB305 (*Antirrhinum major*), AmMYB340 (*Antirrhinum major*), AtMYB24 (*Arabidopsis thaliana*), AtMYB21 (*Arabidopsis thaliana*) and PhEOBII (*Petunia hybrida*). Functional characterization of all of these TFs has demonstrated that they are involved in the regulation of the volatile benzenoid phenylpropanoid metabolic pathway (Sablowski *et al.*, 1994; Moyano *et*

al., 1996; Uimari and Strommer, 1997; Shin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). All of these bioinformatic analysis suggested that *FaEOBII* could be an R2R3 MYB TF potentially involved in the regulation of those metabolic pathways related with volatile phenylpropanoid production in ripe receptacles.



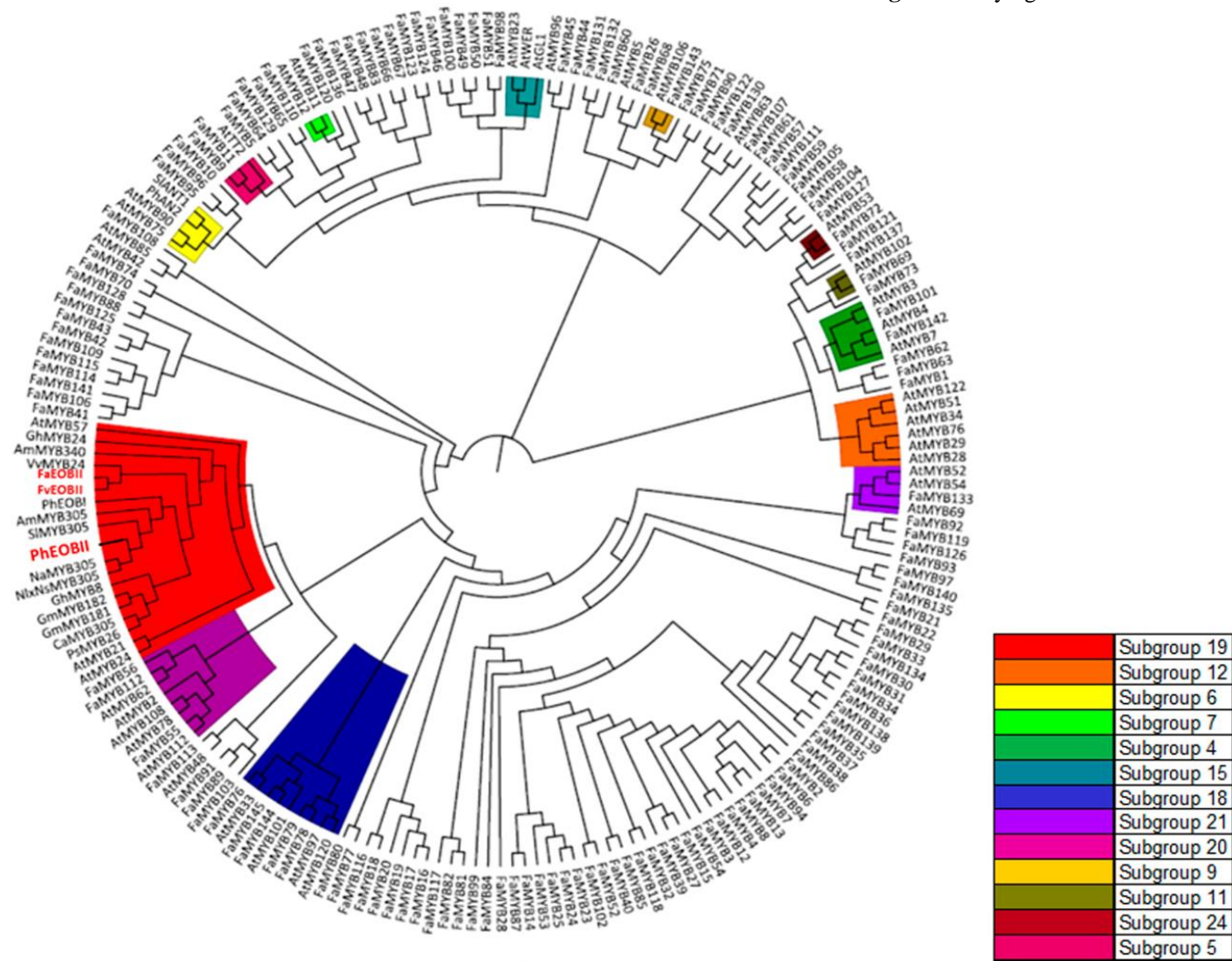
**Figure 3:** Sequence alignment of R2R3-MYB proteins. Identical amino acids are shaded in black. The two MYB repeats (R2 and R3) are indicated with sets of arrows, and the critical Trp (W) residues are indicated by asterisks. The W/Y-MDDIW motif region is indicated with a line (+ indicates conserved amino acids). Numbers indicate amino acid positions.

### **The expression of *FaEOBII* is highly expressed in ripe fruit receptacles and petals and correlates with eugenol production in both tissues**

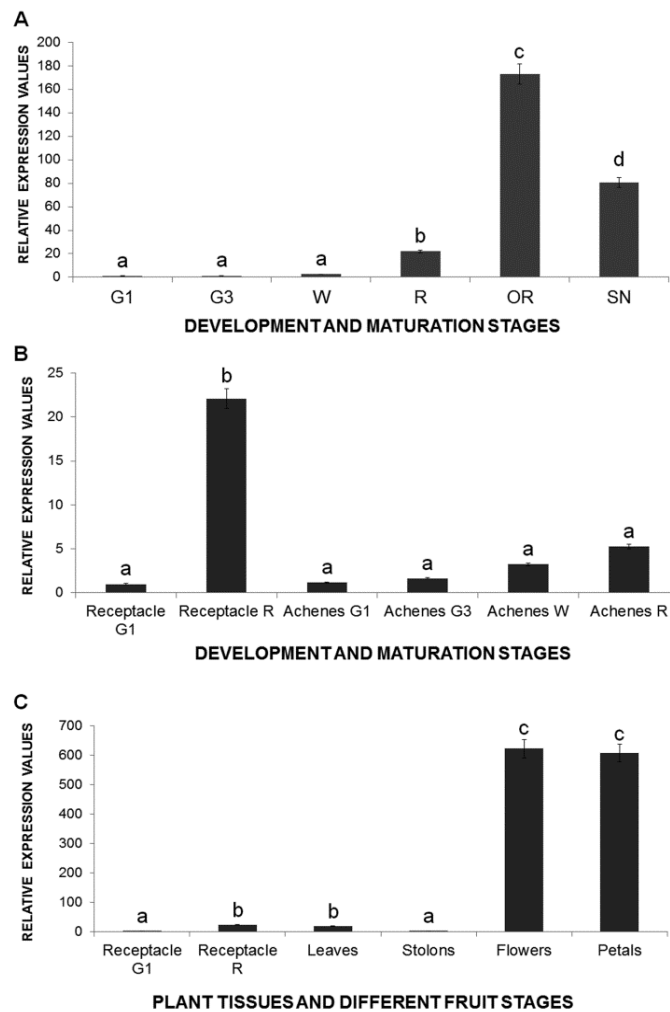
*FaEOBII* gene was expressed at very low levels during fruit receptacle elongation at early developmental stages (G1 and G3), experiencing an increase in receptacle ripening stages (W to OR), with a maximum peak taking place in the overripe stage (OR). This maximum expression was followed by a decrease in expression in the senescent stage (SN) (Figure 5A). On the other hand, when compared with those expression values obtained in fruit receptacle at the R-stage, *FaEOBII* gene was weakly expressed in fruit achenes in all developmental and ripening stages studied (Figure 5B). This low expression was also observed in other vegetative tissues analysed, such as leaves and stolons. However, in flowers and specifically in petals, the amount of *FaEOBII* transcript was higher than in ripe fruits (Figure 5C). These results showed that *FaEOBII* expression was not only up-regulated in ripe fruit receptacle but also in petals.

It was shown that throughout the strawberry fruit ripening process, eugenol accumulates in ripe receptacles (Pyysalo *et al.*, 1979; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012; Aragüez *et al.*, 2013). The orthologous gene of *FaEOBII* in *Petunia hybrida* (*PhEOBII*) has been involved in eugenol production (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Thus, we analysed eugenol production in strawberry fruit receptacles during ripening (Figure 6A), as well as in those plant tissues where a higher *FaEOBII* gene expression was observed (Figure 6B). A clear connection between high *FaEOBII* gene expression during the ripening stages and high eugenol content was found. In fact, the highest levels of *FaEOBII* gene expression and of eugenol content were observed in red overripe receptacles and in petals (Figure 6B). Recently, eugenol production in unripe strawberry fruits has been reported to be mainly restricted to achenes at the green stage (Aragüez *et al.*, 2013) as well as coincident with the expression pattern of the eugenol synthase *FaEGS1* in achenes (Aragüez *et al.*, 2013). Our results indicate that there is also eugenol production in young unripe green receptacles that is coincident with the *FaEGS1* gene expression but not with the expression of *FaEOBII* gene (Figure 6A), discarding a regulatory role of *FaEOBII* in *FaEGS1* gene expression.

Figure 4: Phylogenetic tree of 206 MYB transcription factors.



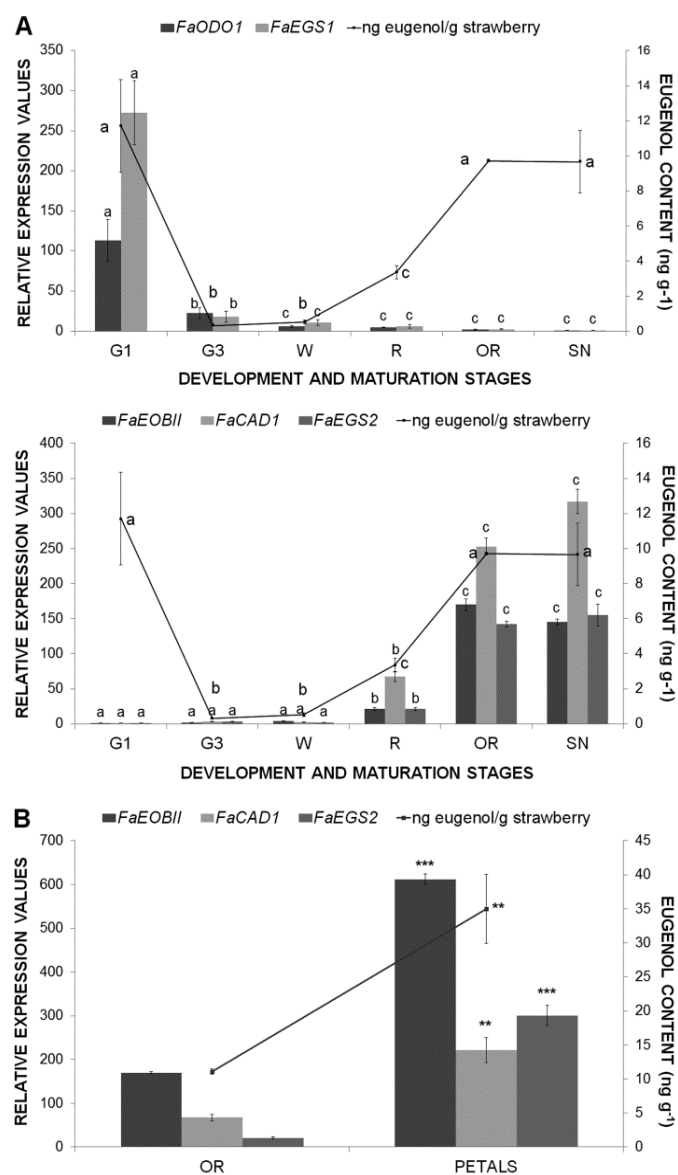




**Figure 5: Analysis by quantitative real-time PCR of *FaEOBII* expression in developing fruit receptacles (A), achenes (B) and plant tissues (C) of *Fragaria x ananassa* “Camarosa”.** G1, small-sized green fruit; G3, full-sized green fruit; W, white stage; R, ripe stage; OR, overripe stage; SN, senescent stage. Quantification is based on  $C_t$  values. Relative expression values were calculated relative to receptacles G1 stage in all cases, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

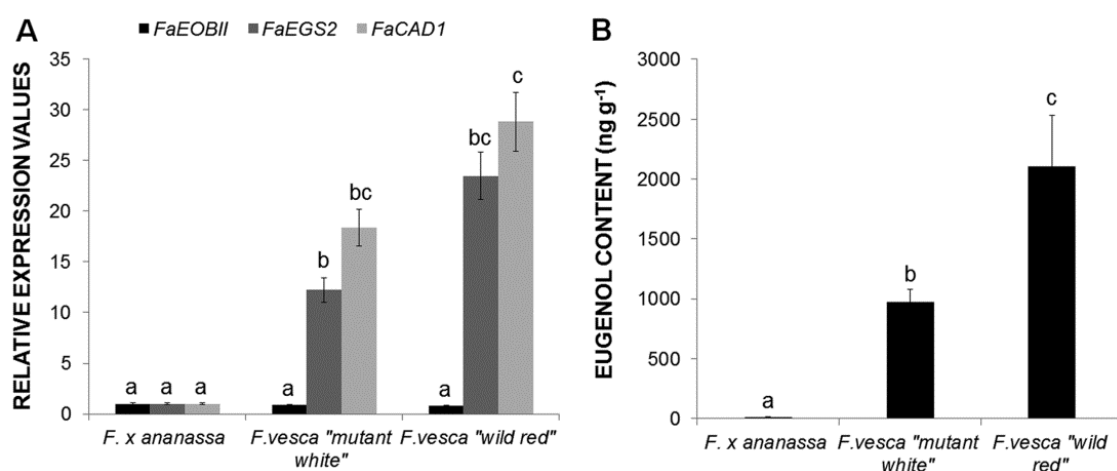
However, in green unripe fruit receptacle, we have detected the presence of an ODO1 orthologous gene (Figure 6A) that could regulate the expression of *FaEGS1* in a similar way to what is described for *PhODO1* (Verdonk *et al.*, 2005). *FaCAD1* encode a cinnamyl alcohol dehydrogenase that produces cinnamyl alcohols that are in turn the substrate for the production of volatile phenylpropanoids as eugenol. This enzyme works up-stream of the *FaEGS2* enzyme in the metabolic pathway that render eugenol. Thus, for this reason, *FaCAD1* and *FaEGS2* genes have been included in the expression studies. Figure 6A showed a clear correlation in the

expression profile of *FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2* during the ripening process of strawberry fruit receptacles, as well as a concomitant increase in the eugenol content along maturation stages

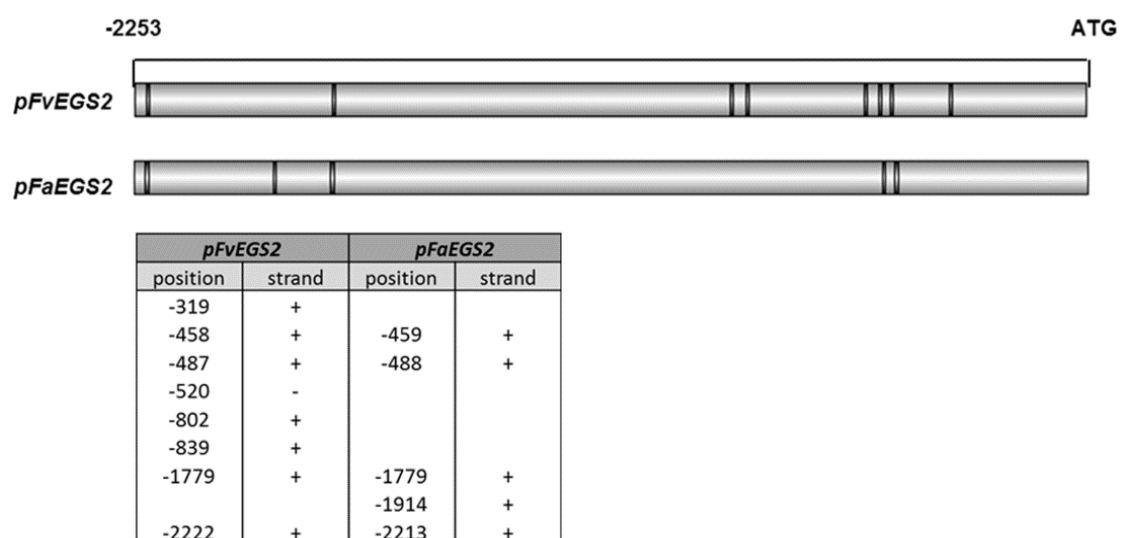


**Figure 6: Analysis of spatio-temporal changes in gene expression and content of eugenol.** (A) Bars represent developmental expression of strawberry *FaODO1*, *FaEGS1*, *FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2* genes in receptacles of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” obtained by qRT-PCR. One-way ANOVA was performed on log transformed data, letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , LSD post-hoc test). (B) Bars represent relative expression values of *FaEOBII*, *FaCAD1* and *FaEGS2* genes in overripe receptacles versus petals. Statistical significance with respect to the reference sample (OR) was determined by the Student’s *t*-test: \*\* $P$ -value  $< 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (A-B) Lines represent GC-MS quantification of eugenol. Values are given in ng of eugenol per g of strawberry (ng g<sup>-1</sup>).

Interestingly, in strawberry fruit receptacle, the expression pattern of *FaEOBII* gene was quite similar to that observed for *FaEGS2* gene. Similarly, eugenol content, as well as the *FaCAD1* and *FaEGS2* gene expression, was higher in *Fragaria vesca* than in *Fragaria* × *ananassa* ripe fruits. In contrast, expression of *FaEOBII* gene was unchanged between both *Fragaria* species (Figure 7). Using the PLACE server (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), several MBSII-boxes recognized by FaEOBII TF were subsequently located along *EGS2* promoter sequences (Figure 8). In view of this bioinformatic analysis of promoter sequences, the *FvEGS2* promoter contains more MBSII-boxes than the *FaEGS2* promoter.



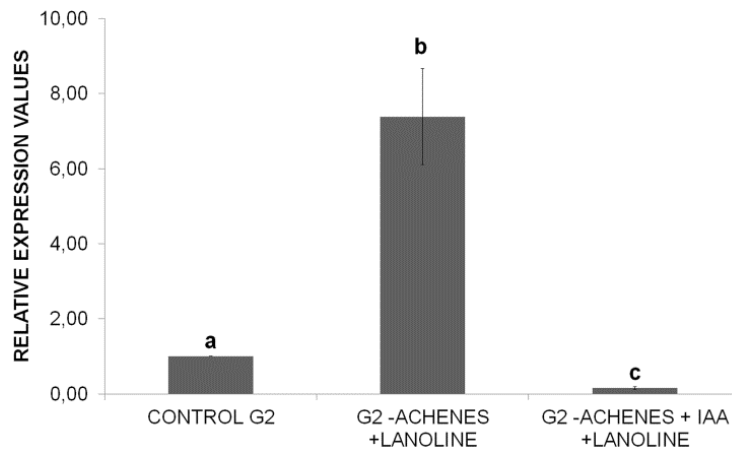
**Figure 7: Analysis of gene expression changes and eugenol content.** (A) Analysis by qRT-PCR of *EOBII*, *EGS2* and *CAD1* gene expression in red ripe receptacles of the cultivated variety of strawberry *Fragaria* × *ananassa* “Camarosa” and in the wild varieties of strawberry *F. vesca* “mutant white” and *F. vesca* “wild red”. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the *F. x ananassa*  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values ± SD of six independent experiments are shown. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test). (B) GC-MS quantification of eugenol in strawberry fruits varieties. Values are given in ng of eugenol per g of strawberry ( $\text{ng g}^{-1}$ ). One-way ANOVA was performed on log transformed data; letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , LSD post-hoc test).



**Figure 8: Schematic diagram of *EGS2* promoter from *F. × ananassa* and *F. vesca* varieties using PLACE online database ([www.dna.affrc.go.jp](http://www.dna.affrc.go.jp)) and DOG 2.0.1 for Windows (Illustrator of Protein Domain Structures). The bar on top indicates the length of the promoter fragment relative to the ATG codon. The location of the MBSII boxes is shown using black lines in the diagram, and their exact position is indicated on the panel.**

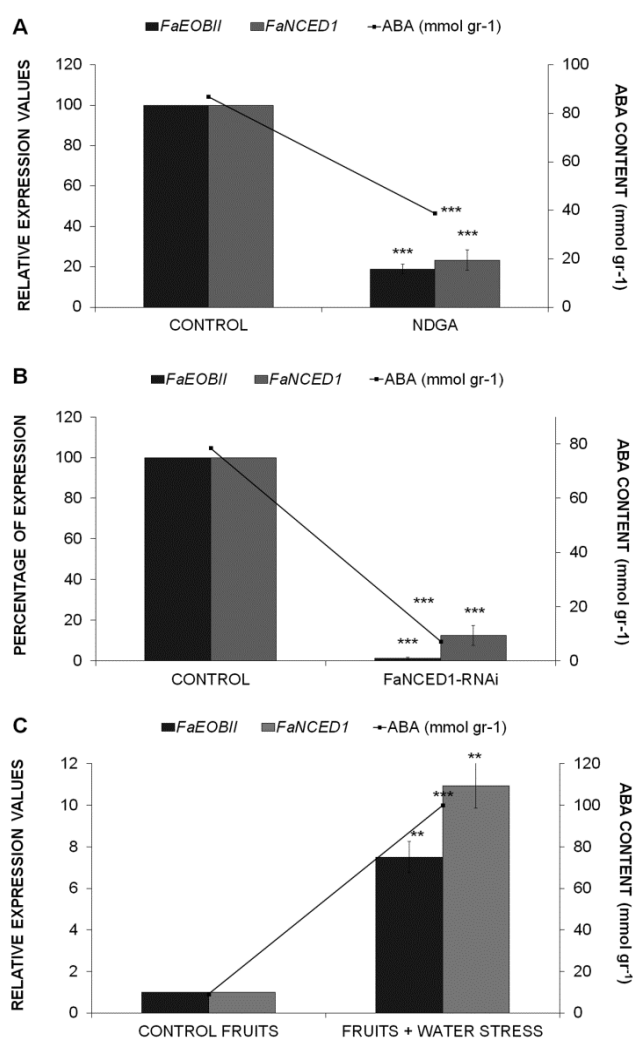
### **The expression of *FaEOBII* is hormonally regulated throughout receptacle fruit growth and ripening**

It has been proposed that ABA/auxin ratio in strawberry fruit receptacles constitutes the signal that triggers the fruit ripening process (Perkins-Veazie, 1995; Jiang and Joyce, 2003). According to this proposal, the auxins that are produced by achenes and released to fruit receptacle would repress the expression of a vast majority of the ripe-related genes (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Manning, 1998; Moyano *et al.*, 1998; Blanco-Portales *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2004; Raab *et al.*, 2006; Medina-Puche *et al.*, 2014). To determine whether *FaEOBII* gene expression was under auxin control, we determined the changes in *FaEOBII* gene expression in unripe (G2) fruit receptacles after removing the achenes from the fruit surface. This treatment reduces the endogenous content of auxins in fruit receptacle. After 5d of treatment, the *FaEOBII* expression level clearly raised when compared with what had been observed in untreated control fruits. This increase in the amount of *FaEOBII* transcript in de-achened fruits was abolished by the external application of auxin (IAA), thus indicating that this gene expression is under the negative control of auxins (Figure 9).



**Figure 9: Analysis of the effects of removing achenes from G2 developing fruits of *Fragaria × ananassa* “Camarosa” on *FaEOBII* expression by quantitative real-time PCR.** Quantification is based on  $C_t$  values, as described in Materials and Methods. Increase in the mRNA value was relative to the receptacle G2  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. G2 CONTROL, middle-sized green fruit receptacle; G2 –ACHENES +LANOLINE, G2 fruit receptacle without achenes for 5 days covered by a lanoline paste; G2 –ACHENES + IAA +LANOLINE, G2 fruit receptacle without achenes for 5 days treated with the synthetic auxin indole-3-acetic acid (IAA) as a lanoline paste with 1 mM IAA. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

Recent reports have suggested that the phytohormone ABA may be involved in the positive regulation of anthocyanin production by promoting strawberry fruit ripening (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). To ascertain if this phytohormone regulates *FaEOBII* gene expression, we modulated the internal receptacle ABA content in three different experimental conditions: (1) by injecting into the interior of fruit receptacle nordihydroguaiaretic acid (NDGA), an inhibitor of the 9-*CIS*-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE (NCED) activity, the key enzyme responsible for the ABA biosynthesis (Figure 10A); (2) by transiently silencing the *FaNCED1* expression through *in vivo* agroinfiltration (Figure 10B), and (3) by depleting water from plants, as water stress is known to increase ABA content in plants (Figure 10C). Under all conditions, a clear variation in the expression of *FaEOBII* gene parallel to the endogenous receptacle ABA content was observed (Figure 10A-C). These results strongly suggest that ABA can positively regulate the expression of *FaEOBII* gene.



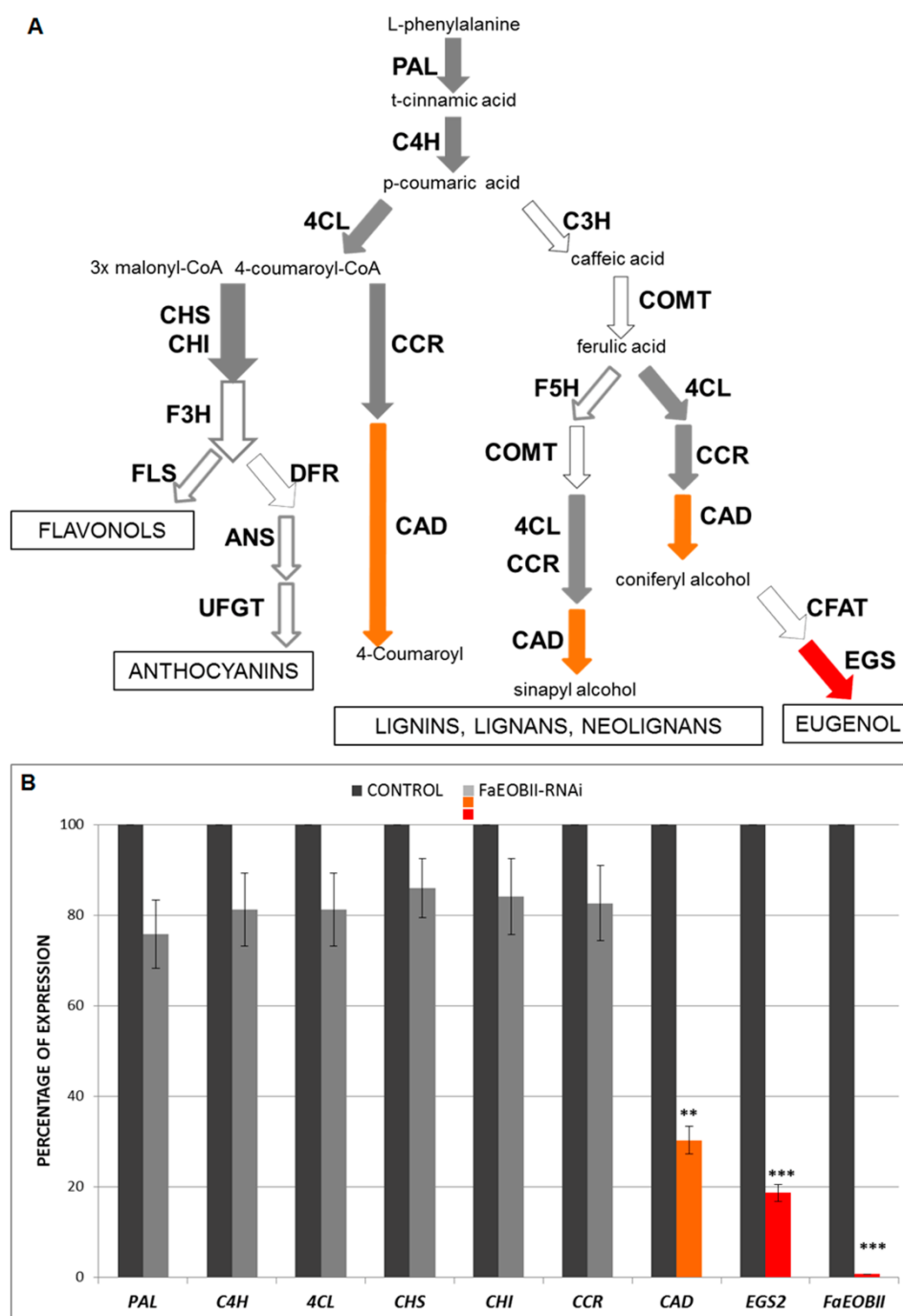
**Figure 10: Analysis by quantitative real-time PCR of *FaEOBII* and *FaNCED1* expression (in bars) and quantification of ABA concentration (in lines): (A) CONTROL, G-W fruits injected with H<sub>2</sub>O; NDGA, G-W fruits injected with NDGA (100  $\mu$ M); (B) CONTROL, control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector; FaNCED1-RNAi, transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with the pFRN-*FaNCED1* construct; (C) CONTROL FRUITS, fruits with the pedicels immersed in MS medium with sucrose; FRUITS + WATER STRESS, fruits with their pedicels kept in the air. Mean values  $\pm$  SD of five independent experiments are shown. Statistical significance with respect to the reference sample (CONTROL) was determined by the Student's *t*-test: \*\**P*-value <0.01, \*\*\**P* <0.001.**

Taken together, these results indicate that *FaEOBII* expression is clearly regulated by both ABA content and auxin content of the fruit receptacle, which provides a putative molecular explanation for both the proposal of Perkins-Veazie (1995) and the findings described by Chai *et al.* (2011), Jia *et al.* (2011) and Medina-Puche *et al.* (2014).

### **FaEOBII can *transactivate* the promoters of genes involved in volatile phenylpropene production in strawberry fruit receptacles**

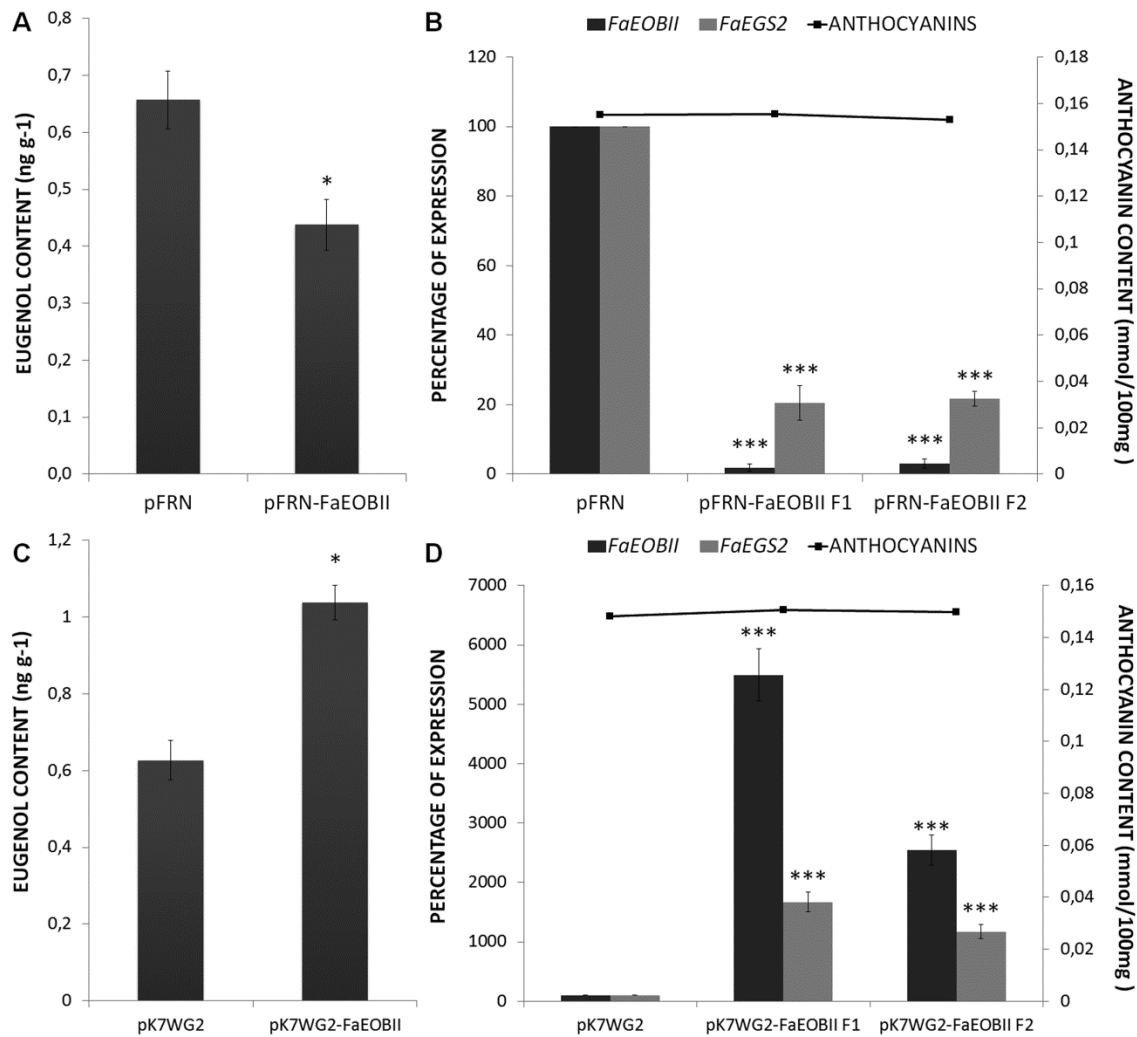
The potential regulatory role played by FaEOBII in the expression of the structural genes belonging to the volatile phenylpropanoid biosynthesis pathway in ripe strawberry receptacles, was assessed through transcriptomic studies. For this purpose, the expression of *FaEOBII* gene was transiently down-regulated in fruit receptacle by RNAi approach. The silencing degree was measured in fruit receptacle by qRT-PCR 14 days after agroinjection. Analysed transgenic fruits showed an important reduction in *FaEOBII* expression ranging between 88.3-99.5%, whereas no changes in *FaEOBII* expression were found in control fruits (Figure 11B-12B). Fruit receptacles that exhibited a silencing percentage above 99 % were used for transcriptomics analysis. A custom-made oligo-based microarray platform representing 34496 putative genes from the *Fragaria* genome (FraGenomics35K) was used. Transcriptome analyses were carried out to compare gene expression profiles of transgenic transiently silenced *FaEOBII* fruits against control fruits that were agroinfiltrated with the empty pFRN vector. The work focused on the most clearly up- and down-regulated genes by choosing a 2.0-fold cut off and a corrected *P*-value < 0.01. This microarray analysis revealed that only 10 transcripts were down-regulated, whereas none transcript was up-regulated in transiently *FaEOBII*-silenced fruits (Table 1; Additional files; Chapter 3; Additional table 3; Additional table 4). Two of them, *FaCADI* (*gene20700*) and *FaEGS2* (*gene25260*) encode enzymes, were involved in the eugenol biosynthesis (Figure 11A). This down-regulation was also corroborated by qRT-PCR (Figure 11B; Additional files; Chapter 3; Additional table 4; Additional table 5). For this reason, eugenol content in *FaEOBII*-silenced fruits was analysed. Results showed a significant decrease of the eugenol content (Figure 12A) in *FaEOBII*-silenced fruits, whereas anthocyanin content remained unchanged (Figure 12B).

In parallel, the expression of *FaEOBII* gene was transiently up-regulated in fruit receptacle by overexpression under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. The increased expression was measured by qRT-PCR and the results showed a statistically increase in both eugenol content (Figure 12C) and *FaEOBII* and *FaEGS2* gene expression (Figure 12D) in the OE-*FaEOBII* receptacles, whereas no changes were detected in the anthocyanin content (Figure 12D).



**Figure 11: *FaEOBII* silencing effect on the expression of the structural genes belonging to the volatile phenylpropanoid biosynthesis pathway.** (A) Schematic diagram of the Phenylpropanoid Pathway in Plants. White arrows indicate non-analyzed genes. Grey arrows represent genes with no significant expression change when *FaEOBII* is silenced. Orange and red arrows represent genes with significant expression change in *FaEOBII*-silenced fruits. (B) Analysis by qRT-PCR of expression of genes involved in the Phenylpropanoid Pathway in *FaEOBII*-silenced fruits agroinfiltrated with the pFRN-*FaEOBII* construct, compared against control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector only. The silencing level is expressed as a percentage. Statistical significance with respect to the reference sample (CONTROL) was determined by the Student's *t*-test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .





**Figure 12: GC-MS quantification of eugenol, qRT-PCR analysis and anthocyanin measurements in *FaEOBII* transitory transgenic fruit receptacles.** (A, C) GC-MS quantification of eugenol in strawberry fruit receptacles with (A) *FaEOBII* expression silenced (pFRN-*FaEOBII*) respect to control fruits (pFRN) and (C) *FaEOBII* expression increased (pK7WG2-*FaEOBII*) respect to control fruits (pK7WG2). Values are given in ng g<sup>-1</sup>. Statistical significance with respect to the reference sample (pFRN or pK7WG2) was determined by the Student's *t*-test: \**P*<0.05. (B, D) Bars represent analysis by qRT-PCR of *FaEOBII* and *FaEGS2* expression in transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with (B) the pFRN-*FaEOBII* construct and in control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector and with (D) the pK7WG2-*FaEOBII* construct and in control fruits agroinfiltrated with the empty pK7WG2 vector. The silencing and overexpression levels are expressed as a percentage. Quantification is based on *C<sub>t</sub>* values as described in Materials and Methods. The values refer to the mRNA *C<sub>t</sub>* value of control samples, which were assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values ± SD of three independent experiments are shown. Lines represent anthocyanin content quantified on fruits analyzed. Statistical significance with respect to the reference sample (pFRN or pK7WG2) was determined by the Student's *t*-test: \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

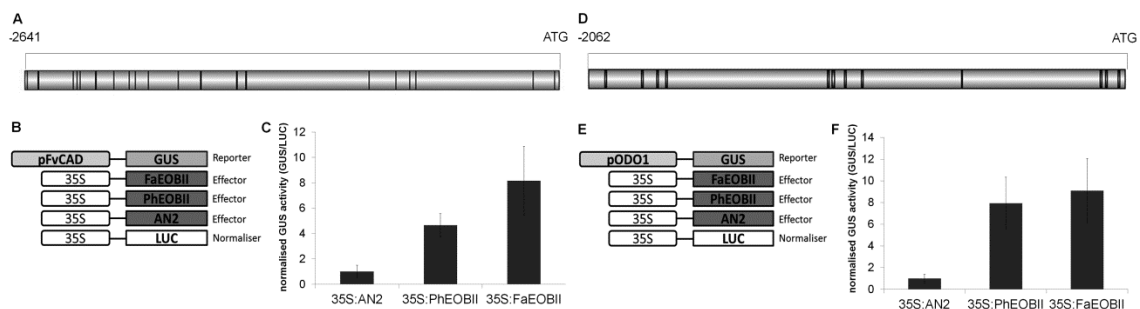
**Table 1: Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Transiently-Silenced *FaEOBII* Fruits and Control Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics* **43**: 109-116).

gene ID	RNAi- <i>FaEOBII</i>	p-value	Annotation	Species	e-value	Accession
gene28435	6.549 down	0.00035	MYB TF emission of benzenoids II (FaEOBII)	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	0.0	KM099230
gene25260	4.019 down	0.00437	eugenol synthase 2 (FaEGS2)	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	4E-148	KF562266.1
gene20700	3.047 down	0.00501	cinnamyl alcohol dehydrogenase (FaCAD1)	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	0.0	U63534.1
gene20643	2.991 down	0.00343	beta-glucosidase 3	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	0.0	JX244263.1
gene32526	2.465 down	0.00262	Dof zinc finger protein	<i>Medicago truncatula</i>	6E-49	XM_003602109.1
gene25718	2.208 down	0.00167	hexokinase	<i>Eriobotrya japonica</i>	3E-179	JF414121.2
gene21312	2.207 down	0.002	gland development related protein 90-like	<i>Gossypium hirsutum</i>	2E-21	EU373080.1
gene12176	2.202 down	0.00174	VERNALIZATION-INSENSITIVE	<i>Theobroma cacao</i>	0.0	XM_007018178.1
gene18910	2.150 down	0.0011	beta-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-104	NM_125991.3
gene06729	2.083 down	0.00487	cytochrome P450	<i>Populus trichocarpa</i>	0.0	XM_002307093.1
gene30534	2.076 down	0.00498	non-specific lipid-transfer protein	<i>Medicago truncatula</i>	2E-22	XM_003620358.1

### FaEOBII can activate the promoter of *FvCAD1* that encodes a key enzyme of the eugenol metabolism

In order to determine the *in vivo* ability to *trans*-activate the promoters of the *FaCAD1* and *FaEGS2*, we have conducted transitory assays on *Nicotiana benthamiana* leaves. After several efforts to clone the *FaEGS2* promoter, we did not succeed. For this reason, in its place we used the *FvCAD1* gene promoter (Figure 13A) for this assay. With this purpose we performed transient *trans*-activation assays of *FvCAD1* promoter from *F. vesca* by the FaEOBII TF in *N. benthamiana* leaves. The *pCAD1*:GUS reporter construct was expressed together with the effector construct 35S:*FaEOBII*. As a control, the same reporter construct was separately co-infiltrated with the R2R3-MYB TFs EOBI (PhEOBI) and ANTHOCYANIN 2 (AN2) effector constructs from *Petunia* (Figure 13B). An 8-fold increase in the reporter gene activation was observed when co-infiltration with *FaEOBII* was compared with control infiltration (AN2). Lower induction value (up to 4.6-fold) was detected with *PhEOBI* as effector (Figure 13C). These results indicate that FaEOBII activates the *FvCAD1* promoter in *N. benthamiana* leaves.

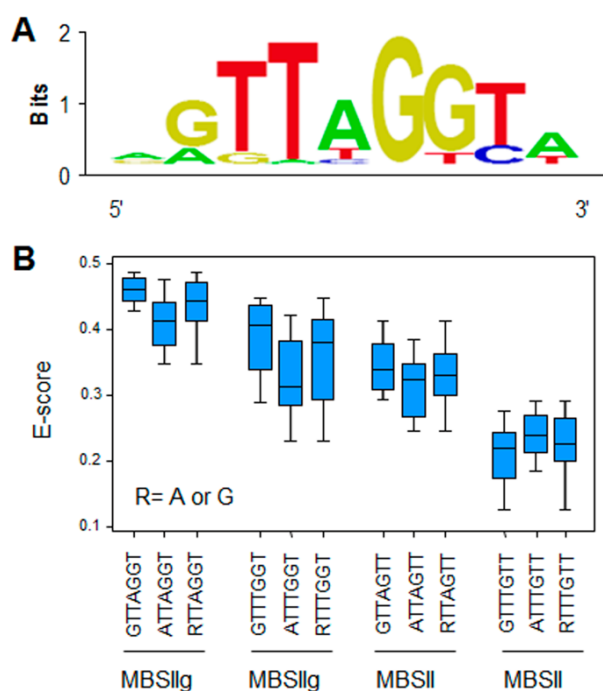
As a positive control of the experiment, the *trans*-activation of the *PhODO1* promoter (Van Moerkercke *et al.*, 2011) by FaEOBII was carried out. The results obtained show the accurate completion of the experiment (Figure 13D-F).



**Figure 13: *Trans*-activation of the *CAD1* promoter of *Fragaria vesca* and the *ODO1* promoter of *Petunia hybrida* cv. Mitchell by EOBI in *Nicotiana benthamiana* leaves.** (A, D) Schematic diagram of *pFvCAD1* and *pODO1* promoters using PLACE online database ([www.dna.affrc.go.jp](http://www.dna.affrc.go.jp)) and DOG 2.0.1 for Windows (Illustrator of Protein Domain Structures). The bar on top indicates the length of the promoter fragment relative to the ATG codon. The location of the MBSII boxes is shown using black lines. (B, E) Constructs used for the *trans*-activation assays. (C, F) Normalized GUS activity after co-infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* harbouring any of the effector constructs with the *pFvCAD1*:GUS or the *pODO1*:GUS reporter constructs. Co-infiltration with the CaMV 35S:AN2 effector was used to show EOBI specificity. Co-infiltration with 35S:LUC enabled normalization (average  $\pm$  SE).

### FaEOBII binds to MYB-binding sequences *in vitro*

To analyse whether FaEOBII could bind to MYB binding DNA-sequences, we determined the DNA-binding specificity of FaEOBII using the PBM11 microarray, which contains all possible 11-mer sequences (Godoy *et al.*, 2011). After array incubation and data processing (Godoy *et al.*, 2011; Berger and Bulyk, 2009), we obtained the list of the top-scoring 8mers, sorted in relation to their enrichment scores (E-scores). The GTTAGGT sequence was obtained with the highest E-score, thus indicating that this motif is recognized with the highest affinity by FaEOBII (Figure 14A). This motif can be interpreted as an MBSIIg-box (GKTWGGTR; R, A or G; K, G or T; W, A or T; Prouse and Campbell, 2012), similar to those obtained for other plant R2R3 MYBs (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014). Given that some R2R3 MYBs also recognize MBSII-elements, we evaluated binding to DNA motifs in which the G nucleotide in the 6th position in the GTTAGGT sequence was replaced by a T residue. In this case, the highest affinity was observed for MBSIIg motifs, in particular to RTTAGGT sequences (Figure 14B). By contrast, binding to their corresponding MBSII elements was very low, thus indicating that FaEOBII does not efficiently recognize these elements (Figure 14B).

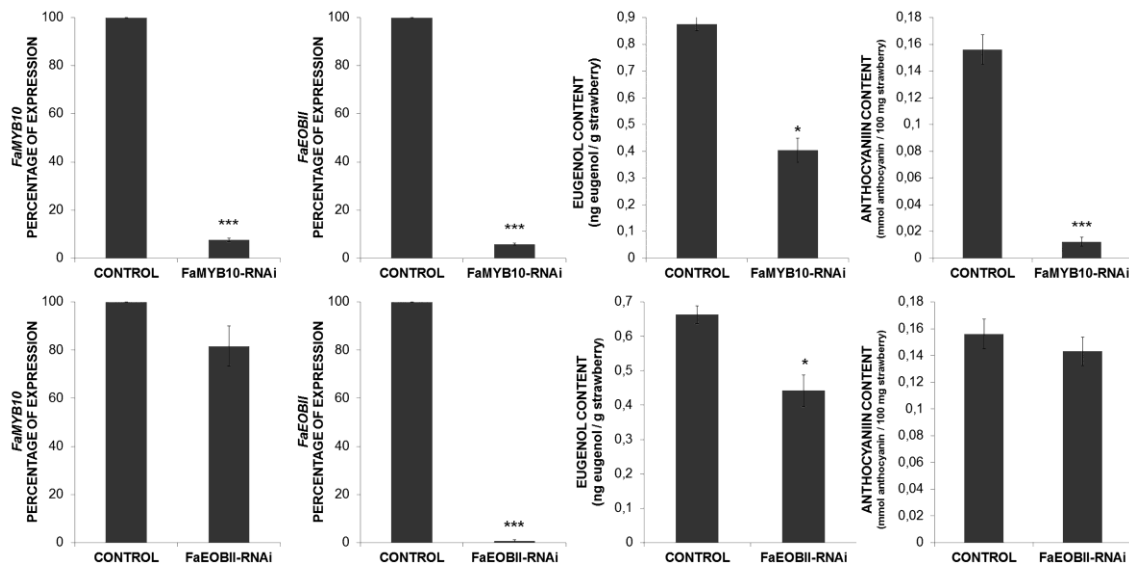


**Figure 14: Identification of FaEOBII-binding motifs *in vitro*.** (A) Position weight matrix (PWM) representation of the top scoring 9-mer obtained in the “seed-and-wobble” algorithm. (B) Box-plot of enrichment scores (E-scores) containing all possible 7-mers indicated representing the MBSIIg and

MBSII elements. Blue boxes represent quartiles 25-75%, and the black line represents the median of the distribution (quartile 50%). Bars indicate quartiles 1-25% (above) and 75-100% (below).

### ***FaEOBII* expression is under the regulation of the *FaMYB10* TF**

In petunia, a flower-specific gene regulatory network has been described which constitutes the phenylpropanoid volatiles biosynthesis pathway that is controlled by three R2R3 MYB TF, ODO1, EOBII and EOBI (Verdonk *et al.*, 2005; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Van Moerkercke *et al.*, 2011; Spitzer-Rimon *et al.*, 2012). Recently, in strawberry it was demonstrated that the transitory silencing of *FaMYB10* gene expression led to a down-regulation of structural genes involved in the flavonoids/phenylpropanoids metabolic pathway (Medina-Puche *et al.*, 2014), as well as the *FaEOBII* expression. We have corroborated these microarray results through qRT-PCR experiments. Thus, we have observed that silencing of *FaMYB10* expression resulted in a concomitant down-regulation of the *FaEOBII* expression, as well as a reduction of both anthocyanin and eugenol content in the strawberry fruit receptacle. However, after silencing of *FaEOBII* expression in fruit receptacle, neither the amount of *FaMYB10* transcripts nor the anthocyanins were reduced, although concentration of eugenol significantly decreased (Figure 15). These results clearly indicate that *FaMYB10* regulates *FaEOBII* expression but not to the contrary, and they support even more involvement of *FaEOBII* in the regulation of eugenol biosynthesis in red-ripe receptacle.



**Figure 15: Quantitative real-time PCR analysis of *FaMYB10* and *FaEOBII* transcript levels and eugenol and anthocyanin content determination in transgenic agroinfiltrated fruits injected with the corresponding RNAi construct. Statistical significance with respect to control simple was determined by the Student's *t*-test: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  ( $n = 10$ ).**

## Discussion

The transcriptional regulatory network of strawberry fruit ripening process is poorly known. So far, the functional role of only a low number of transcription factors that regulate the expression of the ripening-related genes and related metabolic pathways that determine the organoleptic characteristics of the strawberry ripe fruit has been clarified. Thus, by using a heterologous system, it was proposed that the R2R3 MYB TF FaMYB1 plays a repressor role of the expression of phenylpropanoid and anthocyanin structural genes in ripe fruit receptacle (Aharoni *et al.*, 2001). However, transient silencing of *FaMYB1* gene expression in strawberry receptacle did not change the anthocyanin content in transgenic ripe receptacles (Medina-Puche *et al.*, 2014). Similarly, it was demonstrated that the fruit specific and ripening-related *FaMYB10* gene, which encodes an R2R3 MYB TF, regulates expression of early (EBGs) and late (LBGs) structural genes of the flavonoids/phenylpropanoids metabolic pathway (Medina-Puche *et al.*, 2014). Silencing the expression of this TF, in fruit receptacle, reduced the expression of genes involved in anthocyanin and phenylpropanoid volatiles production as well as the expression of a putative MYB TF (*FaEOBII*) (Medina-Puche *et al.*, 2014). This suggests a direct connection between *FaMYB10*, *FaEOBII* and the flavonoid/phenylpropanoids metabolism in ripe fruits. In this chapter, we present the functional characterization of the role played by *FaEOBII* throughout the strawberry fruit ripening process.

### **FaEOBII regulates the expression of two structural genes that play a key role in eugenol biosynthesis in fruit receptacles**

Transcriptomic and qRT-PCR assays in fruit receptacles where the expression of *FaEOBII* was silenced by RNAi showed a decrease in the expression of a small subset of ripening-related genes (Figure 11B; Table 1; Additional files; Chapter 3; Additional table 3; Additional table 4). Among them, we found two genes, *FaCAD1* (*gene20700*, coding a cinnamyl alcohol dehydrogenase) (Blanco-Portales *et al.*, 2002) and *FaEGS2* (*gene25260*, coding an eugenol synthase 2) (Aragüez *et al.*, 2013) that encode for two key enzymes of the metabolic pathway that produces eugenol. FaCAD1 is an enzyme that catalyses the production of monolignols that are precursors of phenylpropenes, such as eugenol. Afterwards, these monolignols alcohols are acetylated in the hydroxyl group by a coniferyl alcohol acyl transferase. FaEGS2 catalyses the reductive cleavage of the acetate moiety, rendering the eugenol (Koeduka *et al.*, 2006; Dexter *et al.*, 2007; Aragüez *et al.*, 2013). In contrast, in *Petunia hybrida*, PhEOBII regulates the expression of a different set of genes involved in the shikimate and phenylpropanoid pathways,

such as *CS*, *CM*, *PAL2*, *CFAT*, *IGS*, *BPBT* and *ODOI* (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Thus, our results indicate that on the contrary of what is described in petunia, in strawberry receptacle, it seems that FaEOBII directly regulates the expression of both *FaCAD1* and *FaEGS2* genes. This possibility was also supported by the fact that FaEOBII can transactivate *in vivo* the *FvCAD1* promoter (Figure 13) and can also specifically bind to MBS-II boxes, MYB *cis* regulatory sequences, which are present in the promoters of those genes regulated by R2R3 MYB TFs (Figure 14). Additionally, the statistically significant decrease of eugenol (Figure 12A) in strawberry fruit receptacles where the expression of *FaEOBII* gene was silenced (Figure 12B) confirms the direct connection between the functional activity of this transcription factor and eugenol biosynthesis. However, as stated previously, the lack of a strong correlation between the percentage of gene silencing and eugenol content reduction could be due to that the amount of transcript (arbitrary units of intensity - a.u.i.) corresponding to *FaEGS2* in ripen receptacle transcriptome is very high (*FaEGS2-gene25260*-a.u.i. 10,732.21). The amount of eugenol quantified in fruits pFRN-*FaEOBII* (Figure 12A) could be explained by two reasons. First, the expression of *FaEGS2* was not reduced sufficiently (Figure 12B) or the residual *FaEGS2* transcript in the fruit could be translated into a sufficient amount of enzyme capable of catalyzing the production of eugenol. Second, the half-life of the enzyme may be high enough so that the detected eugenol was indeed catalyzed by FaEGS2 enzyme in the fruit prior to the silencing of *FaEOBII*.

Furthermore, to confirm the regulatory role of FaEOBII in the biosynthesis of eugenol, qRT-PCR analysis was carried out in fruit receptacles overexpressing the gene *FaEOBII*. The results showed not only an increase in the expression of *FaEOBII* and *FaEGS2* genes (Figure 12D), but also a higher eugenol content respect to control fruits (Figure 12C). Although the increase of eugenol is significant in fruits overexpressing *FaEOBII* respect to control fruits (Figure 12C), it is difficult to expect higher increases. It should be necessary consider that in control fruits, the expression of *FaEOBII* and *FaEGS2* in the transcriptome of red-ripen receptacles is already very high (*FaEOBII-gene28435*-a.u.i. 3,198.538; *FaEGS2-gene25260*-a.u.i. 10,732.21), as well as eugenol content, so the production system of eugenol may be saturated in fruits overexpressing *FaEOBII* and higher increases of eugenol may not be detected.

### ***FvEGS2* and *FaEGS2* have different expression patterns that correlate with MBSII cis-regulatory elements in their promoters**

Gene expression analysis of *EGS2* and *EOBII* were performed by qRT-PCR in ripe *F. vesca* and *F. ananassa* fruits. Significant differences in *EGS2* expression were observed between the two species, up to more than 20-fold in *F. vesca* than in *F. ananassa*, whereas *EOBII* expression

values were constant in both species (Figure 7A). Bioinformatic analysis of promoter sequences located along *EGS2* promoter identified several MBSII-boxes recognized by FaEOBII, containing *FvEGS2* promoter more MBSII-boxes than the *FaEGS2* promoter (Figure 8). These results suggest that higher expression levels of *EGS2* and eugenol content in *F. vesca* than in *F. ananassa* (Figure 7A-B) could be the result of a higher degree of *FvEGS2* promoter activation by FaEOBII due to the presence of a greater number of MBS regulatory boxes (Figure 8). Nevertheless, results in *F. vesca* may also indicate the presence of other TFs that regulate, synergistically with EOBII, the *EGS2* expression.

### ***FaEOBII* expression is ripening related and correlates with eugenol production in different strawberry plant tissues**

Eugenol is the main phenylpropanoid volatile compound that contributes to the strawberry aroma (Pyysalo *et al.*, 1979; Ulrich *et al.*, 1995, 2007; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012). In ripe strawberry fruits, eugenol is biosynthesized by the action of the eugenol synthase FaEGS2, whose coding gene has a ripening-related expression pattern and presents its maximum expression at the red-ripe stage (Aragüez *et al.*, 2013). Besides, the expression of *FaEGS2* was specific to ripe fruit receptacle (Aragüez *et al.*, 2013).

The expression pattern of the *FaEOBII* gene was ripe-related and mainly confined to fruit receptacles, although a high expression level in petals was found (Figure 5). Interestingly, the expression pattern of *FaEOBII* was similar to that of *FaCAD1* and *FaEGS2* (Figure 6A) and other ripening-related genes that are responsible for the organoleptic properties of the strawberry fruit (Medina-Escobar *et al.*, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Trainotti *et al.*, 1999; Benítez-Burraco *et al.*, 2003; Blanco-Portales *et al.*, 2002, 2004; Raab *et al.*, 2006; Griesser *et al.*, 2008; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014). Besides, the maximum *FaEOBII* gene expression as well as *FaCAD1* and *FaEGS2* was found in those tissues, such as red ripen receptacle or petals, where eugenol content was highest (Figure 3B). This indicates that, as in the case of *PhEOBII* in petunia petals (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Van Moerkercke *et al.*, 2011), *FaEOBII* could regulate the expression of those structural genes that are responsible for the production of eugenol in both ripe fruit receptacles and petals.

### **In ripe receptacles, eugenol production is regulated by the interaction between FaMYB10 and FaEOBII**

Recently, the key role played by *FaMYB10* in the regulation of those genes that are part of the flavonoid/pehylpropanoid metabolism has been functionally characterized (Medina-Puche *et al.*,



2014). In this work, after silencing *FaMYB10* expression, a down-regulation of the expression of *FaCAD1*, *FaEGS2* and *FaEOBII* was observed (Medina-Puche *et al.*, 2014). We have confirmed this result by qRT-PCR, and we have also showed that after *FaMYB10* silencing there is a concomitant reduction in the receptacle eugenol content (Figure 15). These results, together with the fact that both TFs share the same expression pattern, support the fact that the expression of *FaEOBII* is under the control of *FaMYB10* during the fruit ripening process. This regulatory network is quite different to the one observed in *Petunia hybrida* petals (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Van Moerkercke *et al.*, 2011). In petunia, the regulation of the production of hydroxycinnamoyl alcohols, phenylpropenes such as eugenol and isoeugenol, as well as other volatile benzenoid compounds, is carried out in a concerted manner by three R2R3 MYB transcriptional factors named PhEOBII, ODO1 and EOBI (Verdonk *et al.*, 2003, 2005; Schuurink *et al.*, 2006; Colquhoun *et al.*, 2010b, 2011, 2011a; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010; Van Moerkercke *et al.*, 2011; Spitzer-Rimon *et al.*, 2012). PhEOBII directly regulates the expression of *ODO1* and *EOBI*, which in turn regulates the expression of several structural genes corresponding to the biosynthesis of volatile phenylpropanoids. On the contrary, in ripe strawberry receptacles, *FaMYB10* would activate the expression of *FaEOBII* that could subsequently trigger both the expression of *FaCAD1* and *FaEGS2* genes and eugenol production. Thus, though the involvement of the EOBI TF in the regulation of the eugenol production has been maintained in both petunia and strawberry, the regulatory loops involved are clearly different. This may be because evolutionary distance between petunia (an asterid) and *F.ananassa* (a rosid).

### ***FaEOBII* expression is hormonally regulated in a similar way to that of other strawberry ripening-related TFs**

As in the case of *FaMYB10*, the *FaEOBII* gene expression was regulated in an antagonist manner by auxins and abscisic acid (ABA), the two most important hormones that control strawberry developmental and ripening processes (Perkins-Veazie *et al.*, 1995; Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). Thus, the decline in the inner contents of auxins in green unripe receptacle gave rise to an increased *FaEOBII* expression (Figure 9). This expression model has been described for other receptacle-specific and ripening-related genes (Moyano *et al.*, 1998; Blanco-Portales *et al.*, 2002; Raab *et al.*, 2006; Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013). On the contrary, when ABA content in the receptacle was diminished by transient silencing of *FaNCE1* expression or inhibition of the corresponding enzyme activity by the inhibitor NDGA, a decrease in *FaEOBII* expression was observed. However, when the concentration of ABA was increased in fruit receptacle as a consequence of subjecting the fruits to water stress, an increase in *FaEOBII* gene expression was observed

(Figure 10). In both climacteric and non-climacteric fruits, water deficiency generated a raise in ABA content, which accelerated ripening and was accompanied by changes in both metabolites and gene expression (Castellarin *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2010). This dual regulation has also been observed for other genes whose expression is also up-regulated throughout the strawberry fruit ripening process (Cumplido-Laso *et al.*, 2012; Daminato *et al.*, 2013; Molina-Hidalgo *et al.*, 2013) and molecularly support both the proposal of Perkins-Veazie (1995) and the findings described by Chai *et al.* (2011), Jia *et al.* (2011) and Medina-Puche *et al.* (2014). This hormonally regulated expression pattern was also similar to that observed for the case of *FaMYB10* gene (Medina-Puche *et al.*, 2014), and it strengthens the relationship between *FaMYB10* and *FaEOBII*. In this sense, we can not discard that the hormonal regulation of *FaEOBII* could be indirect as a result of the regulation of *FaEOBII* expression by *FaMYB10*.



## **CHAPTER 4**

### **Functional characterization of FaPRE1, a ripening-related bHLH regulator involved in strawberry fruit receptacles elongation**

**Footnote:**

The nucleotide sequence reported in this chapter has been submitted to GenBank under accession number *FaPRE1* (KM655802).

**CHAPTER 4****Functional characterization of FaPRE1, a ripening-related bHLH regulator involved in strawberry fruit receptacles elongation****Abstract**

Strawberry fruit receptacles elongation is a characteristic event that takes place during the development and early ripening process of strawberry. Many enzymes involved in this event are widely described in the literature but very few deep knowledge about hormonal and transcriptional regulation has been elucidated. It has been attributed to the gibberellins and brassinosteroids a direct role in the control of the elongation, not only of fruits but also of other vegetative tissues of plants, through various transcription factors. We have identified and functionally characterized a bHLH transcription regulator (*PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 1* [*FaPRE1*]) that seems to be the orthologous gene of *AtPRE1* and *OsIL11* from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, respectively, that contribute to regulate the size and shape of parenchymal cells of the leaves. The expression of *FaPRE1* was ripening related and fruit receptacle specific and correlated with the increase in the ratio length/width of strawberry fruit receptacle along development and ripening stages. Also, *FaPRE1* was repressed by auxins, activated by abscisic acid (ABA) and no significant changes were detected under gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) treatments in fruit receptacle, however in vegetative tissues GA<sub>3</sub> treatments induced an increase of *FaPRE1* expression and morphological changes leading to elongated plants. Stable transgenic plants overexpressing *FaPRE1* showed elongated phenotypes however no significant changes were detected in the size of leaves although chlorophyll and anthocyanin content were altered respect to wild type plants. Also, fruit receptacles showed a greater elongation corroborated by histological analysis that showed a different size and shape of mesenchymal cells as well as a different tissue organization. Transcriptomic studies of these transgenic receptacles combined with transient silencing of *FaPRE1* in fruit receptacles allowed us to identify a small group of common genes differentially regulated under both conditions respect to control fruits. Among them, it was identified a subgroup of genes that belong to cell wall functional group identified as cell wall-modifying enzymes. Besides, overexpression of *FaPRE1* led to a down-regulation of two cell elongation-related genes (*gene29570*, *ovate family protein* (AOF) and *gene21137*, *BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYLS 4* (*BILA*)) promoting cell elongation simultaneously through two independent routes, GA and BR signalling respectively, placing putatively FaPRE1 in the middle of a crossroads between paths.

## Introduction

bHLH proteins are the second largest group of transcription factors in angiosperms and carry out diverse functions in many developmental and physiological processes in all eukaryotic organisms (Feller *et al.*, 2011). Classification, based on evolutionary relationships and phylogenetic analysis of more than 500 plant bHLHs, allows subdivide them into 26 sub-groups (Pires and Dolan, 2010). Moreover, the inclusion of atypical bHLH proteins extended the number of subgroups to 32 (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). It has been reported that *Arabidopsis* genome contains more than 150 bHLH proteins of which only 30 % have been functionally characterized to date (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Pires and Dolan, 2010) leading to an increase in the characterization of similar regulators from other plant species and crops of interest (Carretero-Paulet *et al.*, 2010).

According to the sequence, bHLH domain is highly conserved and contains two functionally distinct regions. The basic region, located at the amino terminus of the proteins, contains 13-17 basic amino acids that confer the ability to bind to the hexanucleotide E-box DNA motif CANNTG, where N correspond to any nucleotide, or to the non-canonical or E-box-like sequences (e.g. CACGCG and CATGCG) in *C. elegans*. In this case, DNA sequences flanking these hexamers contribute to DNA-binding specificity (Grove *et al.*, 2009). In more than 50 % of plant bHLHs, the basic region contains at least five basic amino acids and a highly conserved HER domain (His<sup>5</sup>-Glu<sup>9</sup>-Arg<sup>13</sup>) predicted to bind DNA (Massari and Murre, 2000; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). The helix-loop-helix (HLH) region, located at the carboxi terminus of the proteins, comprises two amphiphatic  $\alpha$ -helices rich in hydrophobic amino acids connected by a loop of variable length. The presence of HLH motif confers the ability to establish homo- or heterodimeric connections with other bHLH proteins, essential for DNA recognition and DNA-binding specificity (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). Thus, in *Arabidopsis* PAR1 family, conserved Leu<sup>23</sup> and Leu<sup>52</sup> residues are structurally necessary for dimer formation (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). On the other hand, bHLH proteins not only may dimerize with each other but may also be able to interact with non-bHLH proteins (Herold *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2007). According to DNA-binding ability, these proteins are classified into two groups; DNA-binding bHLH and non-DNA-binding bHLH (HLH), also called as atypical bHLH, (Lee *et al.*, 2006; Roig-Villanova *et al.*, 2007) which could act as negative regulators of other bHLH protein by forming heterodimers (Castelain *et al.*, 2012). They were particularly diverged at the basic region and usually lacked sequence features characterized as critical for proper DNA binding (Massari and Murre, 2000).

In plants, bHLHs are involved in developmental processes such as stomata development, root hair formation and control of petal size (Pires and Dolan, 2009); in the regulation of light signaling (Castelain *et al.*, 2012) as well as in the regulation of metabolic pathways of biosynthesis of certain hormones such as brassinosteroids (BRs) (Friedrichsen *et al.*, 2002), abscisic acid (ABA) (Abe *et al.*, 2003) and auxins (Roig-Villanova *et al.*, 2007; Schlereth *et al.*, 2010). Recent studies have shown antagonistic roles of HLH/bHLH proteins in various plant organ sizes. For example, in *Oryza sativa* the antagonistic pair of bHLH proteins, ILI-IBH1 (*increased leaf inclination1*, *IL11*, Os04g54900) controls cell length in the lamina joint and leaf bending. Similarly, PRE1-IBH1 (*paclobutrazol resistance 1*, *PRE1*) regulates cell elongation in *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2009). Besides, *ILI-1*, the homologous gene from rice to *Arabidopsis* *PRE1*, has been shown to be involved in the BR signaling pathway, as is the closely related rice gene *BUI* (*brassinolid upregulated1*, Os06g0226500; Tanaka *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009), but neither its expression nor its activity was related to GA signaling (Tanaka *et al.*, 2009). Recently, it has been identified in rice an antagonistic pair of bHLH proteins involved in determining grain length through control cell length in the lemma/palea. Thus, overexpression of the atypical non-DNA-binding bHLH partner *PGL1* (*POSITIVE REGULATOR OF GRAIN LENGTH 1*) increased grain length and weight in transgenic rice acting as an inhibitor of its partner APG (*ANTAGONIST OF PGL1*), a typical DNA-binding bHLH, through heterodimerization (Heang and Sassa, 2012). One of the atypical bHLHs, KIDARI (*KDR/PRE6*, At1g26945), was proposed to be involved in light signaling (Hyun and Lee, 2006). KIDARI belongs to the *BANQUO* genes subgroup. Among them, three members (*BNQ1*, *BNQ2* and *BNQ3*) have been reported to be expressed in floral organs and to be involved in light signaling thanks to their physical interaction in the yeast 2-hybrid system with HFR1, a bHLH involved in FR and blue light signaling (Mara *et al.*, 2010). It has been described a second subgroup of atypical bHLH genes, partially redundant with the *BANQUO* genes, probably involved in gibberellic acid (GA) signaling (Lee *et al.*, 2006). Indeed, results obtained through its overexpression, such as paclobutrazol resistance, complementation of the *gai-1* mutant dwarf phenotype and phenotypic changes, including a long hypocotyl and early flowering (Lee *et al.*, 2006), suggest that this subgroup of atypical bHLH genes have redundant functions in the GA signaling pathway. Recent studies suggest a role for PRE3/ATBS1/bHLH135/TMO7 (At1g74500) in the regulation of the BR signaling pathway given that its up-regulation leads to complement the phenotype of the BR receptor weak-allele mutant *bri1-301* (Shang *et al.*, 2011). Interestingly, overexpression of *PRE1/BNQ1/bHLH136* or *KDR/PRE6* could also complement *bri1-301*, indicating that these two genes also regulate the activity of transcription factors involved in the regulation of BR signaling and leading to proposals that the gibberellin-or light-related phenotypes were indirect and linked to the deregulation of BR signaling (Castelain *et al.*, 2012). In addition, Schlereth *et al.* (2010) showed that PRE3/ATBS1/bHLH135 is also a target



of monopteros (TMO7) and is required and partially sufficient for the auxin monopteros (MP)-dependent root initiation indicating a potential role of this atypical bHLH gene in auxin signaling. These results suggest that several non-DNA-binding or atypical bHLH genes could have both specific and overlapping redundant or complementary functions in *Arabidopsis*.

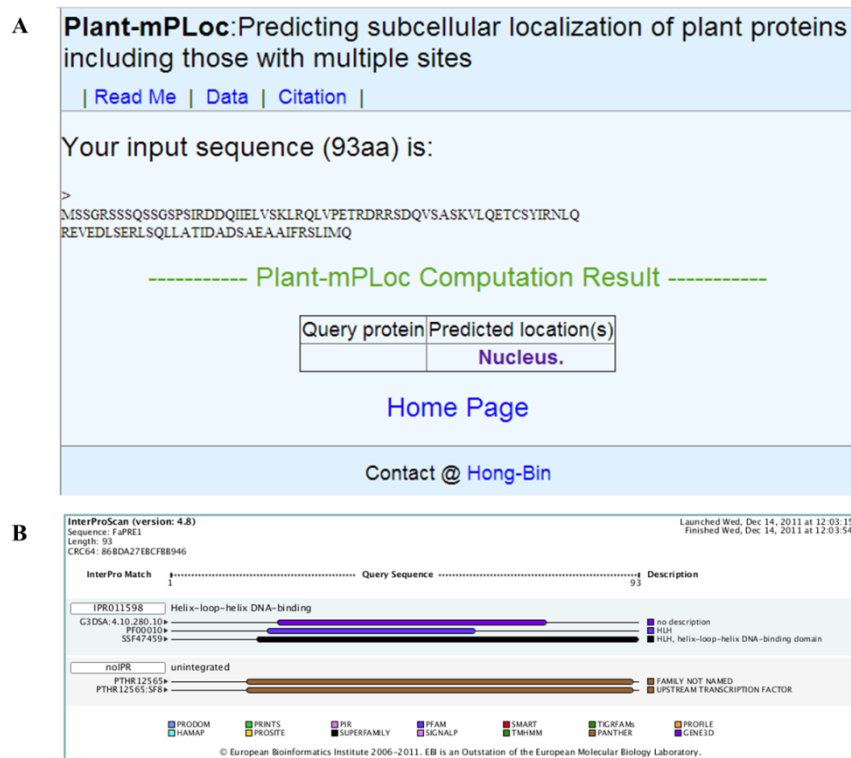
In this study, we have identified *FaPRE1* gene, which encodes a transcription factor type of helix-loop-helix (HLH) that belongs to a family of basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional regulators in strawberry. *FaPRE1* belongs to the atypical group and very little is known about the signaling pathways in which atypical bHLH participate. Moreover, *FaPRE1* is homologous to *PRE1* from *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2006) and *ILI1* from rice (Zhang *et al.*, 2009), both proteins related to the regulation of cell elongation regulated by gibberellin or brassinosteroids. The microarrays analysis indicated that *FaPRE1* expression is fruit-specific, clearly inducible in fruit ripening stages and negatively regulated by auxin produced by immature achenes. On the other hand, indicated a potential role of this transcription factor in cell elongation of cells composing the fruit receptacle and, therefore, in determining the size and/or fruit shape. It is expected that overexpression of this gene in transgenic plants promote obtaining altered transgenic phenotypes. The subsequent transcriptome analysis will enable us to realize if in these fruits physiological processes are regulated by this gene.

## Results

### Isolation and characterization of *FaPRE1* gene and protein

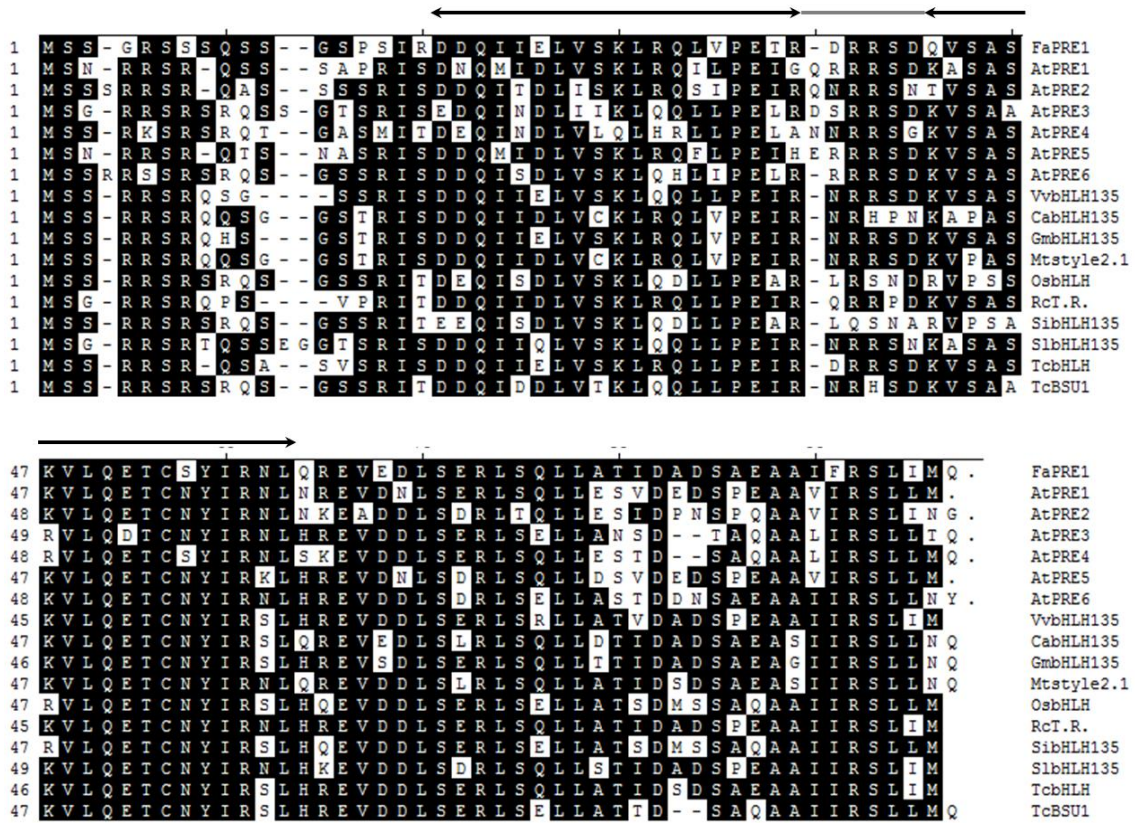
Previous high-throughput analysis carried out in our research group comparing transcriptomes of green immature *versus* red-ripened strawberry receptacles using a 35 k microarray oligo-based platform, allowed the identification of a gene that encoded a putative bHLH TF (*FaPRE1*) strongly up-regulated in ripe fruits. The full-length *FaPRE1* cDNA isolated contained an open reading frame of 292-bp encoding a polypeptide of 93 amino acid residues with a predicted molecular mass of 10.38 kDa and a pI of 4.95, and also contains 131 and 303 bp of the 5'- and 3'-untranslated regions respectively. *FaPRE1* protein is rich in Ser (19.4 %), Arg (10.8 %), Leu (10.8 %) and Gln (8.6 %) residues. In addition, *FaPRE1* protein analysis using blastp program from NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) showed that *FaPRE1* encodes a bHLH TF similar to other PRE TFs described in *A. thaliana* and other organisms whose sequences are deposited in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Moreover, the bioinformatic prediction of *FaPRE1* subcellular localization using Plant-mPLOC program (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLOC.cgi>) indicated that this protein could have a nuclear localization (Figure 1A). In fact, the amino acidic analysis of *FaPRE1* sequence with

InterProScan software tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5>) revealed the existence of signatures resembling a bHLH domain constituted by a helix-loop-helix motif (Figure 1B). This domain is highly conserved in all members of PRE family in *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2006) (Figure 2). It is important for interaction with transcription factors and lacks a basic region at the amino terminal, so that interaction with regulatory elements in the promoter regions courses through a bHLH TF binding partner.



**Figure 1: Screenshots corresponding to the results of protein localization sites prediction in cells performed with the Plant-mPLoc computer program (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLoc.cgi>) (A) and prediction of domains and functional sites performed with InterProScan database (version 5) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5>) (B).**

Phylogenetically, FaPRE1 shares high homology (58.5-79.1 percentage of identity) with several members of this subgroup from other plants such as *Glycine max* bHLH135 (XP\_003534454), style2.1 from *Medicago* (XP\_003621179.1), style2.1 from *Solanum* (NP\_001234290.1), style2.1 from *Ricinus* (XP\_002520108.1), and AtPRE1 (NP\_198802) (Figure 2). Based on these features, FaPRE1 can be classified into atypical bHLH subgroup 16 of the 32 plant bHLH subfamilies (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) (Figure 3; Additional files; Chapter 4; Additional table 1).

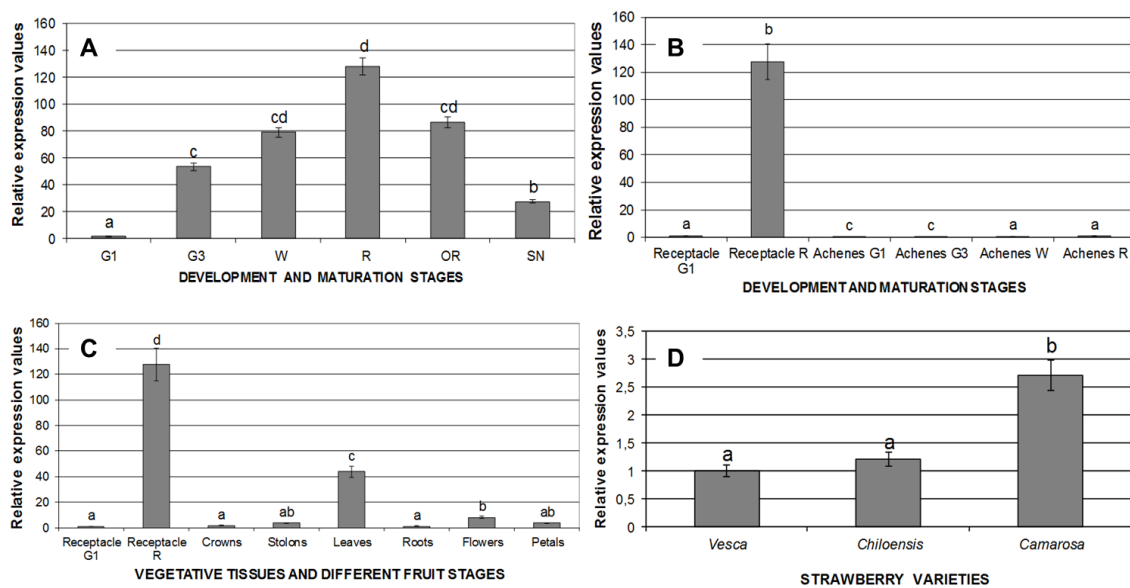


**Figure 2: Sequence alignment of bHLH proteins.** Identical amino acids are shaded in black. The two helix are indicated with sets of black arrows and the loop is indicated with a grey line. Numbers indicate amino acid positions.



## Gene expression studies

The expression analysis of *FaPRE1* by qRT-PCR validated the results previously obtained by microarray analysis. Thus, in fruit receptacles of the cultivated *F. × ananassa* “Camarosa” variety, *FaPRE1* was expressed at very low levels during the first development stage (G1), increased at G3 and W stages, and reached a maximum peak of expression in the ripe stage (R) with a slight decrease in the overripe stage (OR), reaching low expression levels in senescent stage (SE) (Figure 4A). This expression profile is coincident with the typical growth curve of strawberry fruits described in Moyano-Cañete *et al.*, 2013, where the greatest fruit growth happens in G3 and R stages. In contrast, transcript levels in achenes are negligible with respect to the receptacle (Figure 4B), indicating that *FaPRE1* gene expression is mostly present in receptacle. Besides, *FaPRE1* expression is not significant in vegetative tissues except stolons and leaves (Figure 4C). This may be an indicator of the PRE genes function in cell elongation along the receptacle development in the ripening process. *FaPRE1* expression was also analysed in ripe fruits of different strawberry varieties (*Fragaria vesca*, wild variety; *Fragaria chiloensis*, parent variety; *Fragaria × ananassa* “Camarosa”, commercial variety). Results showed increased transcript accumulation of *FaPRE1* in Camarosa fruits (Figure 4D).



**Figure 4: Analysis by quantitative real-time PCR of *FaPRE1* expression** in developing fruit receptacles (A), achenes (B) and vegetative tissues (C) of *Fragaria × ananassa* “Camarosa”, and ripe receptacles of different strawberry varieties (D). G1, small-sized green fruit; G3, full-sized green fruit (G1 and G3: stages of development); W, white stage; R, ripe stage; OR, overripe stage; SN, senescent stage. Results were obtained using *FaPRE1* specific primers and quantification is based on  $C_t$  values. Relative expression values were calculated relative to receptacles G1 stage (A-C) or *F. vesca* ripe receptacles

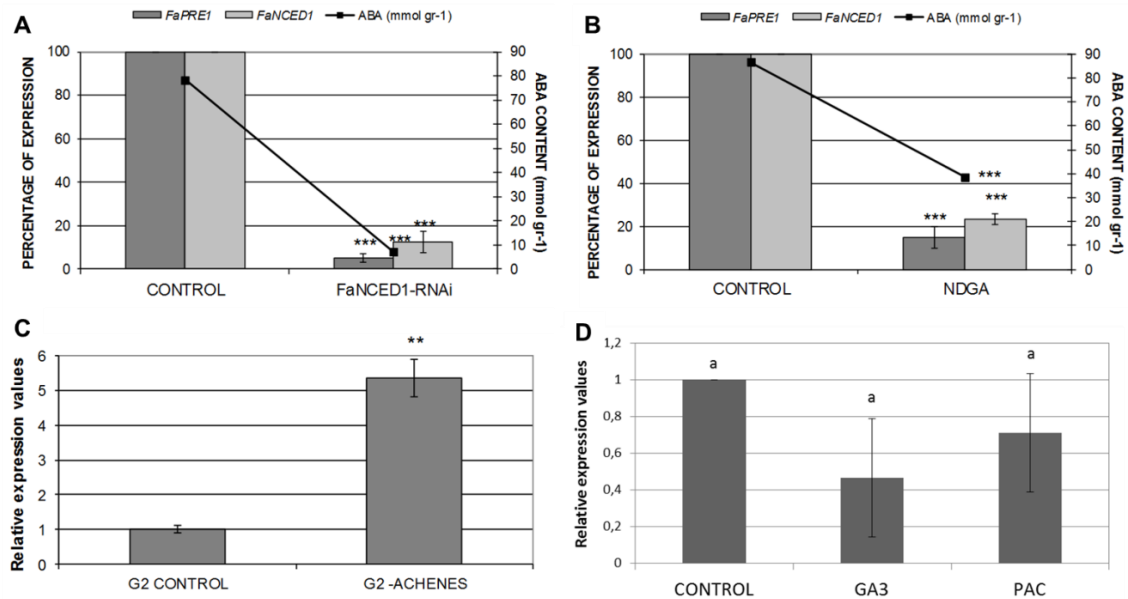
(Vesca) (D), which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean  $\pm$  SD of five independent experiments. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

### **Hormonal regulation of the *FaPRE1* gene in strawberry fruit receptacles**

It has been proposed that a defined ABA/auxin content ratio presents 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 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 deached green fruits at the G2-stage. On the other hand, recent reports have suggested that the internal ABA concentration in fruit-receptacle may be involved in anthocyanin production during the ripening of strawberry fruits (Chai *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011; Medina-Puche *et al.*, 2014). To determine whether *FaPRE1* gene expression was under the control of these two plant hormones, comparative gene expression analyses were carried out. To achieve a deeper understanding of the role of the phytohormone ABA in the regulation of *FaPRE1* gene expression, we decreased the ABA content in the fruit receptacle through two experimental approaches: 1) by transiently silencing the expression of the *FaNCED1* gene coding 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase, the key enzyme responsible for ABA biosynthesis (this was accomplished through *in vivo* agroinfiltration with live *Agrobacterium* cells harbouring *FaNCED1*-RNAi constructs (Figure 5A); 2) by adding nordihydroguaiaretic acid (NDGA), a well-known inhibitor of this 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase activity that is required for ABA biosynthesis (Figure 5B). The reduction of ABA content in strawberry fruits treated compared with untreated control fruits was accompanied by an important decline in the amount of *FaPRE1* transcript (Figure 5A-B) as well as other strawberry ripening related genes (Molina-Hidalgo *et al.*, 2013; Medina-Puche *et al.*, 2014; Medina-Puche *et al.*, 2015; Molina-Hidalgo *et al.*, 2015). This expression pattern suggests that the *FaPRE1* expression could be direct or indirectly modulated by the ABA present in the strawberry receptacles. On the other hand, *FaPRE1* gene expression in deached fruits (G2-achenes) was higher than in the control fruits (G2) indicating that the expression of this gene was negatively regulated by auxins released from the achenes into the fruit receptacle (Figure 5C).

It has been demonstrated a relation between gibberellic acid and bHLH gene expression that positively regulates organ elongation (Hyun and Lee, 2006; Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). In *A. thaliana*, GA regulates cell elongation by inducing the expression of *PRE1* (Lee *et al.*, 2006). In strawberry fruit receptacles, the relation between GA and *PRE1* gene expression has

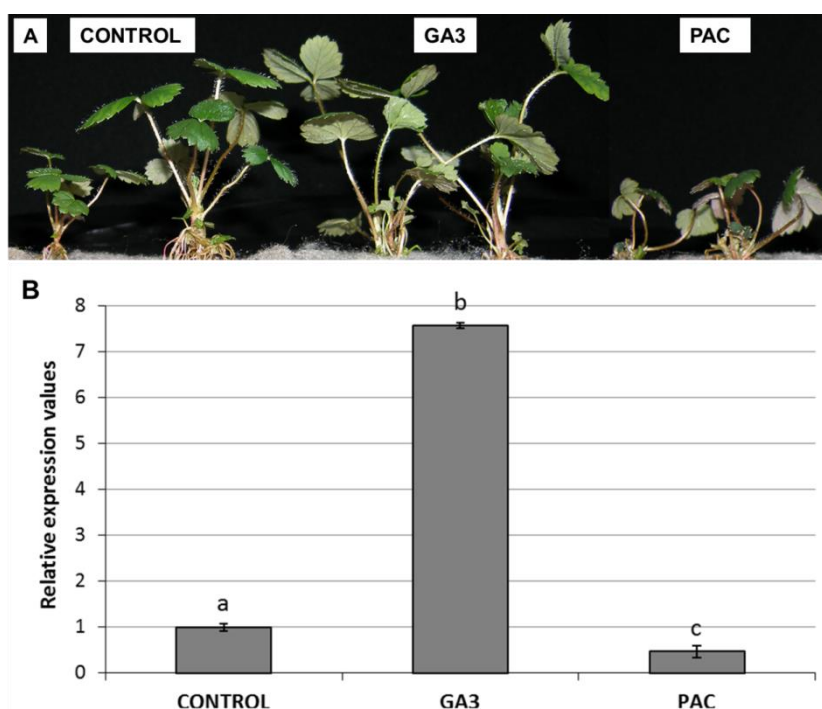
not been studied, although endogenous GA content has been measured in strawberry fruits during development and maturation (Csukasi *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2012). To clarify whether there is a direct relationship between GA and *FaPRE1*, strawberry fruit receptacles were injected with GA<sub>3</sub> and paclobutrazol (PAC), a GA biosynthesis inhibitor (Butcher *et al.*, 1990). No significant changes were detected in the *FaPRE1* expression between treated fruits versus control fruits (Figure 5D) and no phenotypic changes were detected in treated fruits compared to controls (data not shown).



**Figure 5: Analysis by quantitative real-time PCR of the hormonal effects in *FaPRE1* gene expression using specific primers.** Analysis of *FaPRE1* and *FaNCED1* gene expression (bars) in (A) strawberry G-W fruits agroinfiltrated with the *FaNCED1*-RNAi construct and (B) 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 removing achenes from G2 developing fruits on *FaPRE1* gene expression. (D) Analysis of the effects of gibberellins on *FaPRE1* expression. (A) CONTROL, strawberry fruits infiltrated with empty pFRN vector; *FaNCED1*-RNAi, transgenic strawberry fruits agroinfiltrated with the pFRN-*FaNCED1* construct; (B) CONTROL, G-W fruits injected with H<sub>2</sub>O; NDGA, G-W fruits injected with NDGA (100 μM); (C) G2 CONTROL, middle-sized green fruit receptacle; G2 – ACHENES, G2 fruit receptacle without achenes for 5 days. In all experiments, quantification is based on C<sub>t</sub> values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the CONTROL C<sub>t</sub> value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Values are mean ± SD of five independent experiments. Statistical significance was tested with one-way ANOVA and a Scheffe post-hoc test on log-transformed data or with a Student's *t*-test using SPSS software. Statistical significance is displayed with letters ( $P < 0.05$ ) or asterisk (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### Hormonal regulation of *FaPRE1* gene expression in vegetative tissues from *in vitro* strawberry plants

Gibberelins are essential hormones that affect several events of plant growth and development, including stem elongation. *PRE1* was identified and characterized in *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2006). Its expression is early gibberellin inducible in the wild-type plants and plays a regulatory role in various aspects of gibberellin-dependent growth and development in this plant (Lee *et al.*, 2006). We examined whether *FaPRE1* induces its expression under gibberellic acid treatments. Thus, strawberry plants treated with GA<sub>3</sub> showed an increase of *FaPRE1* expression and suffered morphological changes that resulted in elongated plants. In addition, we studied the effect of paclobutrazol (PAC) on the morphology of the strawberry plants and *FaPRE1* expression. As result of the treatment with PAC, plants displayed a dwarfed phenotype and a reduced *FaPRE1* expression level was detected (Figure 6). These results indicate that *FaPRE1* expression responds positively to GA<sub>3</sub> levels in strawberry plants, suggesting an active role for *FaPRE1* in gibberellin signaling.



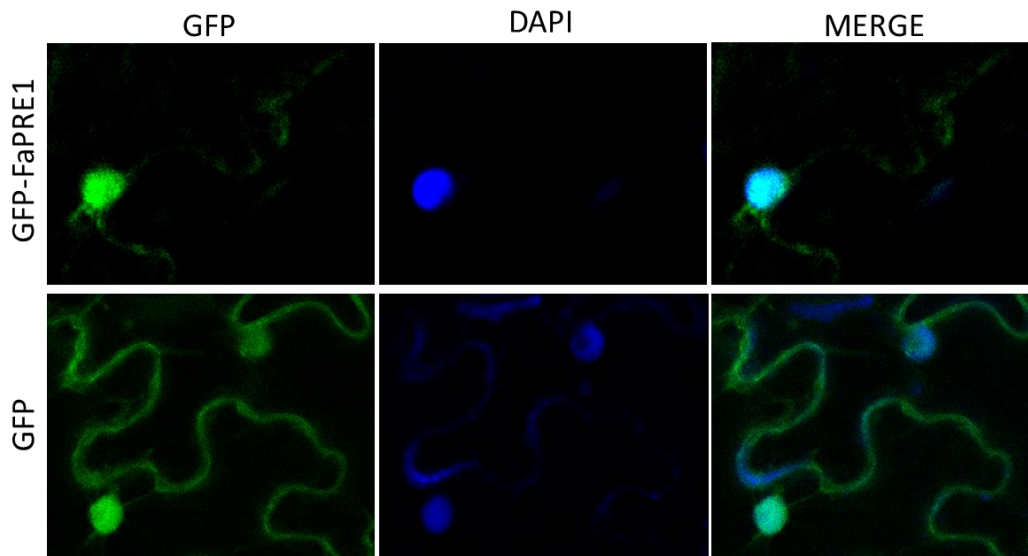
**Figure 6: Phenotypic analysis of *Fragaria × ananassa* “Chandler” *in vitro* plants grown in N30K medium supplemented with hormones.** (A) General view of control plants (CONTROL) and treated plants with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and paclobutrazol (PAC) after 11 dpt. (B) Analysis by quantitative real-time PCR of *FaPRE1* expression of *in vitro* strawberry plants (*Fragaria × ananassa* cv Chandler) treated with GA<sub>3</sub> and PAC. The results were obtained using *FaPRE1* specific primers. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative



to the CONTROL  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. CONTROL, plants in N30K medium; GA<sub>3</sub>, plants in N30K medium supplemented with gibberellic acid 100  $\mu$ M; PAC, plants in N30K medium supplemented with paclobutrazol 100  $\mu$ M. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

### FaPRE1 protein is located in nucleus

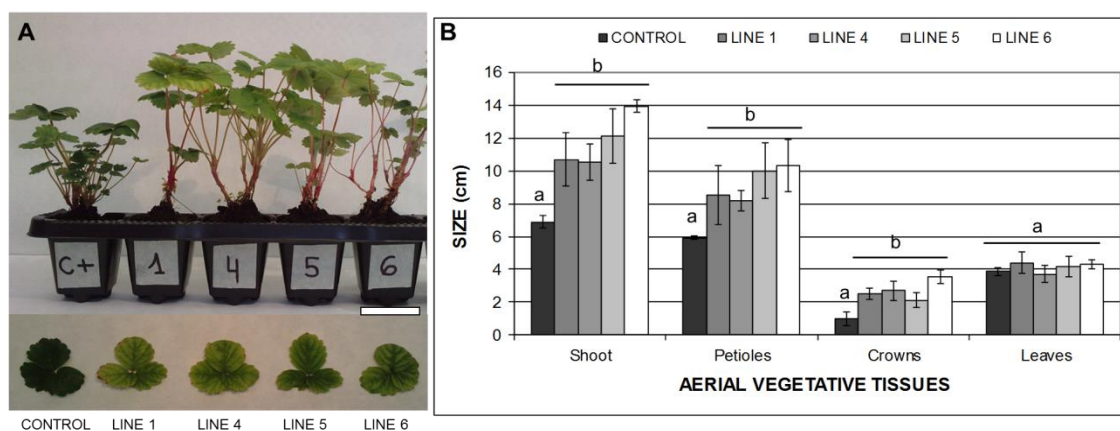
Bioinformatics studies indicated that the deduced FaPRE1 protein could be located in nucleus (Figure 1A). To confirm this hypothesis we determined the subcellular localization of FaPRE1 protein “*in vivo*”. For that, N-terminal translational fusion protein construct between the FaPRE1 and the GFP protein was created under the control of CaMV 35S promoter. This construct was transiently expressed in *N. benthamiana* leaves and as it was expected, confocal imaging of the fusion protein revealed co-localization of FaPRE1 protein with the nucleus marker DAPI in the parenchyma cells of the abaxial epidermis of tobacco leaves, confirming its nuclear localization (Figure 7).



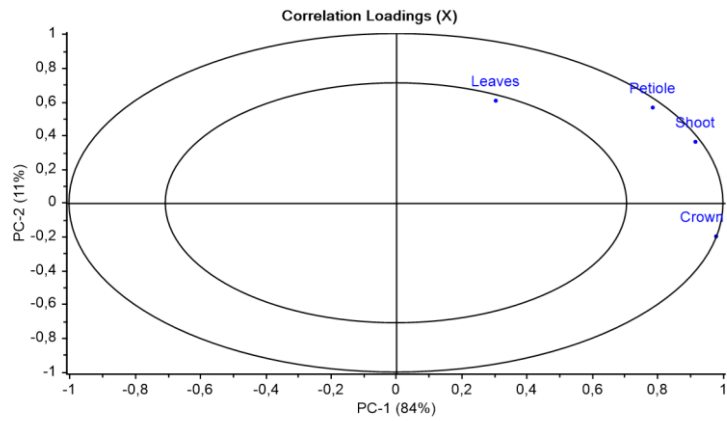
**Figure 7: Subcellular localization of the FaPRE1 protein in *Nicotiana benthamiana* leaves.** The leaves of *Nicotiana benthamiana* were agroinfiltrated with translational constructs 35S::GFP::FaPRE1 and with 35S::GFP as control. Fluorescence signal detected using a confocal microscope from GFP-FaPRE1 (upper) and GFP (lower) expression under the 35S promoter in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermis cells; GFP, green fluorescent protein; DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole; MERGE, merged view of the GFP and DAPI images.

### ***FaPRE1* overexpression in strawberry plants increases the size of the aerial parts, except leaves**

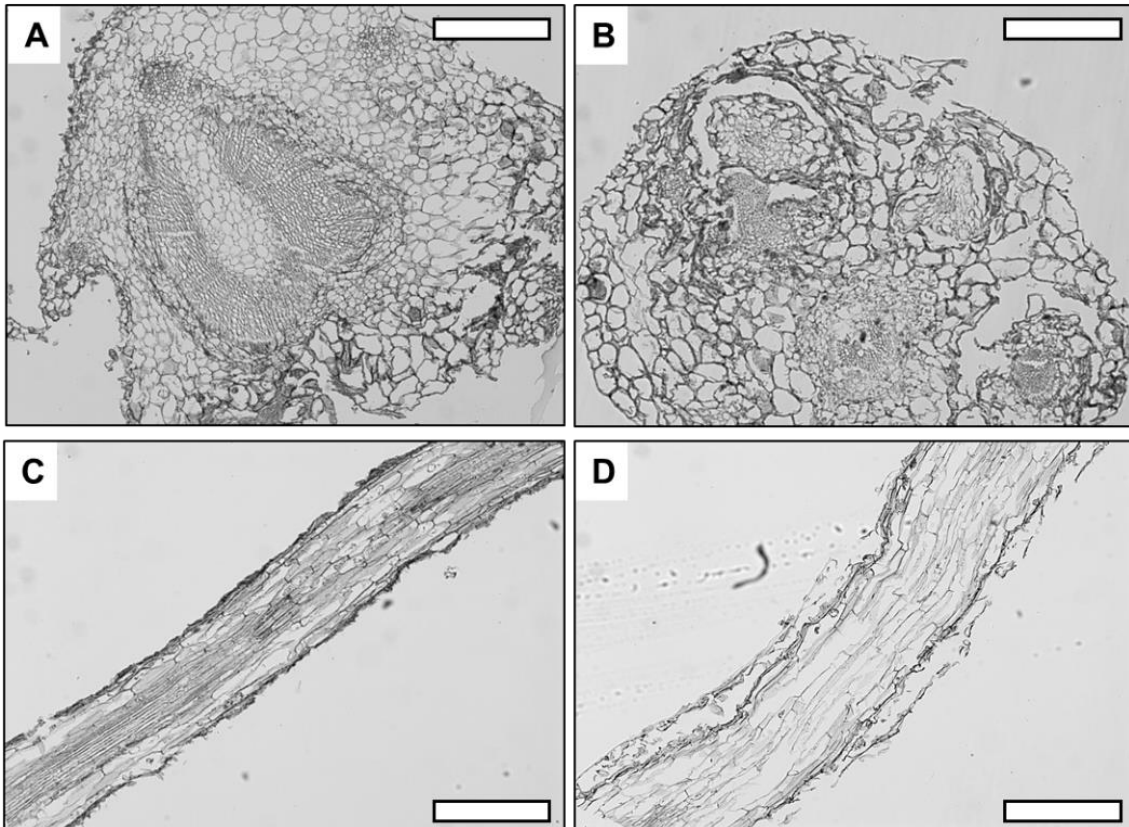
*FaPRE1* is an atypical bHLH gene that is included in the predicted bHLH genes of strawberry (Shulaev *et al.*, 2011; www.strawberrygenome.org) and is reported to be homologous to *Arabidopsis* PRE1 that regulates cell elongation (Lee *et al.*, 2006) and rice ILI-1 that controls cell length in the lamina joint and leaf bending in rice (Zhang *et al.*, 2009). *FaPRE1* was overexpressed by using the CaMV 35S promoter to induce ectopic gene expression in all tissues of the plant. Twelve independent transgenic lines overexpressing *FaPRE1* (*FaPRE1*:OX lines) were produced but only four lines (lines 1, 4, 5 and 6) were selected for further studies in detail because they showed differentiated phenotype compared to control plants (Figure 8A). Thus, the complete aerial part from the selected transgenic lines exhibited a significant increase in length up to 2-fold respect wild types. This increase in the shoot length is due to a greater elongation of petioles and crowns (Figure 8B). However, no significant changes were detected in leaves (Figure 8A-B). PCA test was performed to corroborate the results observed (Figure 9). Besides, optical microscopy images obtained showed an altered cellular distribution in crown and root (Figure 10).



**Figure 8: Phenotypic analysis of the transgenic *Fragaria × ananassa* “Chandler” plants transformed with the pK7WG2-*FaPRE1* construct.** (A) General view of control plant and transgenic lines overexpressing *FaPRE1* gene 30 days after their acclimation in soil. (B) Quantification of aerial vegetative tissues length of the selected control and transgenic plants. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test). Scale bars = 5 cm.



**Figure 9:** PCA test of independent transgenic lines overexpressing *FaPRE1* compared to control plants.

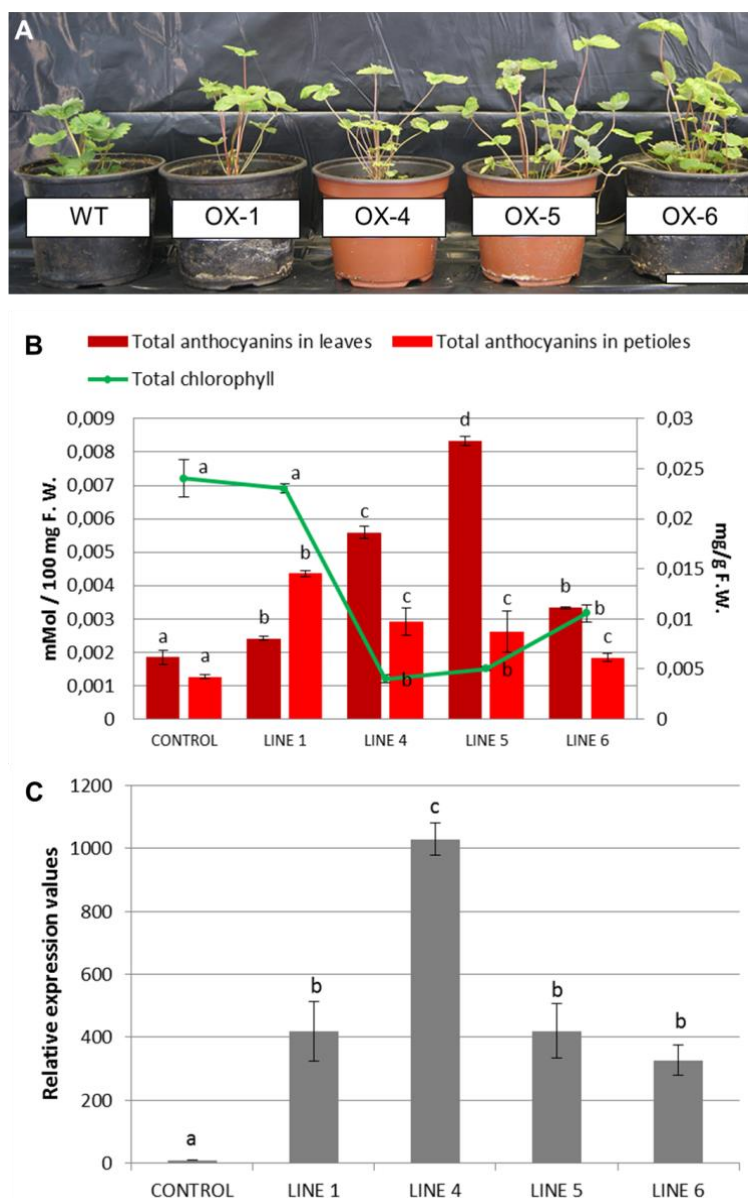


**Figure 10:** Cellular changes in transgenic crown (B) and root (D) overexpressing *FaPRE1* gene compared with the control crown (A) and root (C) respectively. Scale bars: (A-D) = 200  $\mu\text{m}$ .

### Chlorophyll and anthocyanins levels are affected in *FaPRE1:OX* plants

Although no significant differences exist in the size of the leaves themselves, it was observed a decrease of their color (Figure 8A, Figure 11A). For this reason, we proceeded to quantify the

content of chlorophyll and total anthocyanins in leaves and petioles. The results showed an increase of the total anthocyanins amount accompanied of a decrease of chlorophylls level in the transgenic lines analyzed (Figure 11B). Moreover, these changes were more pronounced in line 4 where the *FaPRE1* gene expression was higher (Figure 11C). Thus, we concluded that it exists a connection between *FaPRE1* overexpression and the chlorophyll and total anthocyanins content in leaves from *FaPRE1:OX* plants.

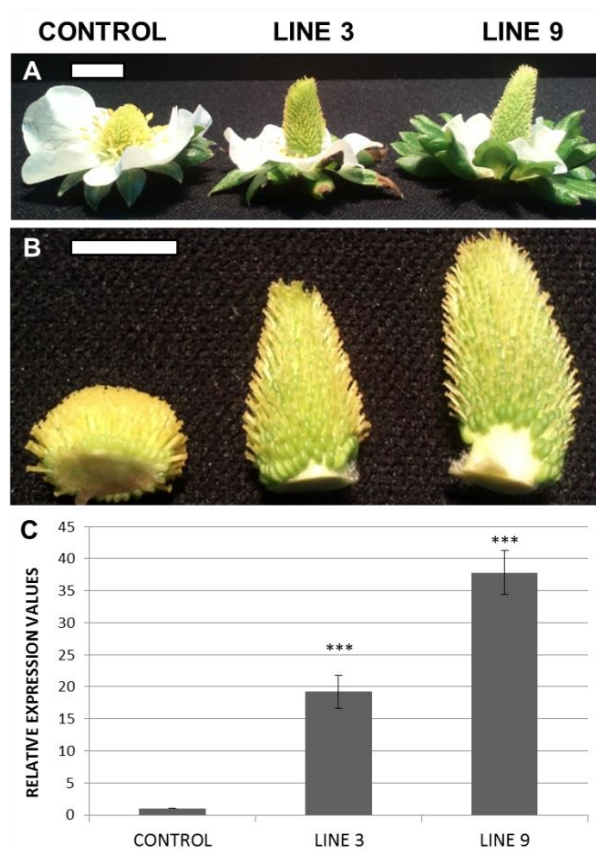


**Figure 11: Phenotypic analysis of the transgenic *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” plants transformed with the pK7WG2-*FaPRE1* construct.** (A) General view of control (WT) and transgenic lines overexpressing *FaPRE1* (OX) 60 days after their acclimation in soil. Scale bars = 10 cm. (B) Analysis by qRT-PCR of *FaPRE1* gene expression in leaves of control and transgenic lines 1, 4, 5 and 6. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA

value was relative to the CONTROL  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. (C) Chlorophyll and anthocyanin quantification in leaves and petioles of control and transgenic lines 1,4,5 and 6. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. Letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Scheffe post-hoc test).

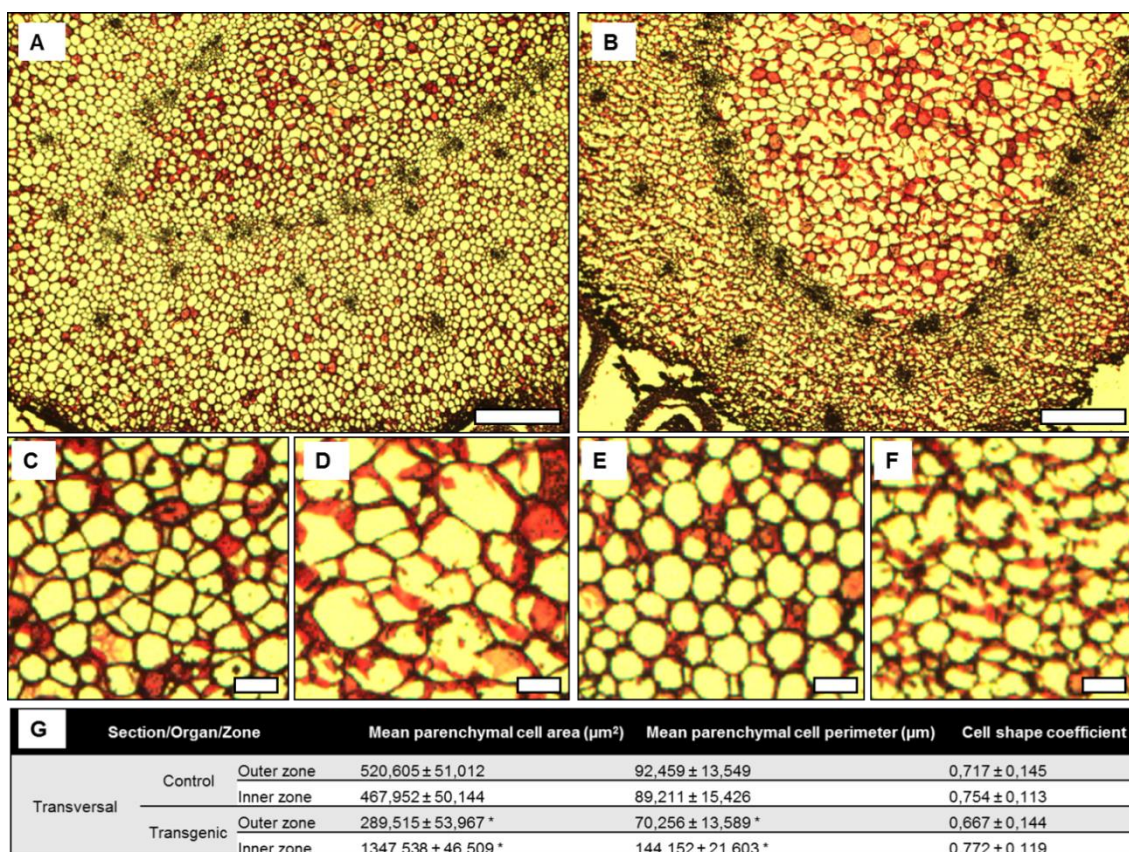
### ***FaPRE1* overexpression alters the size and shape of the strawberry fruit receptacle cells**

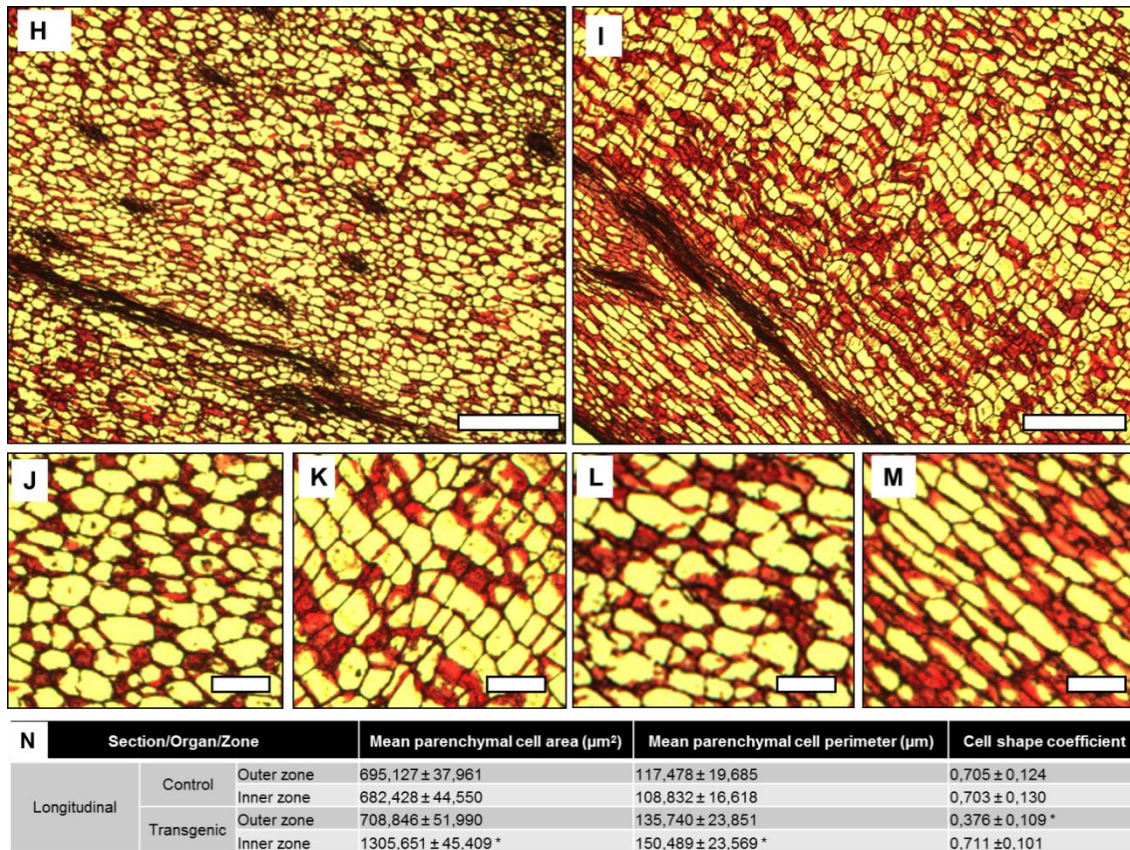
Given that *FaPRE1* overexpression in petioles and crowns results in long shoots, we expected that similar results were obtained in strawberry fruit receptacles. Thus, studies in greenhouse with flower buttons from transgenic plants that started flowering were carried out. Initially, a clear phenotype difference between the buttons of the wild types and transgenic *FaPRE1:OX* lines was observed. For that, two transgenic lines with different flower buttons sizes were selected for further study. These buttons, as well as already seen in crowns and roots (Figure 8), showed greater elongation comparing to wild types (Figure 12A-B). When the degree of *FaPRE1* overexpression was analyzed by qRT-PCR, these results showed a clear increase of its expression of up to 37-fold over wild types (Figure 12C), correlated with the degree of elongation of flower buds.



**Figure 12: (A-B) Phenotype and (C) analysis by qRT-PCR of *FaPRE1* gene expression in floral button of transgenic plants overexpressing *FaPRE1* (LINE 3 and 9) compared with the control plants (CONTROL).** Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the CONTROL  $C_t$  value of experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (\*\*\*)*P*-value <0.001). Scale bars (A-B) = 1 cm.

Histological analysis of these tissues by light microscopy revealed that the increase in the length of flower buds is caused by an increase in the area and perimeter of the inner marrow cells (Figure 13). These results indicate that phenotype of flower bottoms is altered when *FaPRE1* is overexpressed. It is appreciated, not only on the macroscopic level greater elongation of the structure, but also at microscopic level in a different tissue organization and an increase in cell size in certain areas.

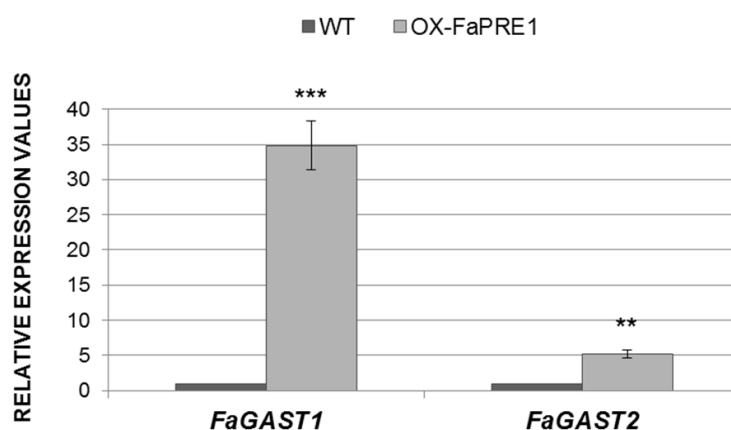




**Figure 13: Cellular changes in transgenic floral button overexpressing the *FaPRE1* gene compared with the control.** (A-F) Transversal sections of parenchymal tissue from control (A, C and E) and transgenic floral button (B, D and F). (C and D) Transversal sections of inner zone from control (C) and transgenic (D) floral button. (E and F) Transversal sections of outer zone from control (E) and transgenic (F) floral button. (H-M) Longitudinal sections of parenchymal tissue from control (H, J and L) and transgenic floral button (I, K and M). (J and K) Longitudinal sections of inner zone from control (J) and transgenic (K) floral button. (L and M) Longitudinal sections of outer zone from control (L) and transgenic (M) floral button. (G and N) Quantitative study of the size and shape of floral button cells in control and transgenic floral button. The cell shape coefficient indicates the shape of the cells. Thus, the more similar value of the index is to 1, the more spherical the cells. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test. \**P* <0.001. (A-B; H-I) Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ ; (C-F; J-M) Scale bars = 25  $\mu\text{m}$ .

***FaPRE1* overexpression induces *FaGAST1* and *FaGAST2*, both genes involved in cell morphology.**

*FaPRE1* overexpression in flower buds (Figure 12) modified cell morphology and induced a clear increase on the parenchymal cells size (Figure 13). Parallel, an increase in *FaGAST1* and *FaGAST2* expression levels were detected (Figure 14).



**Figure 14:** Analysis by qRT-PCR of *FaGAST1* and *FaGAST2* gene expression in floral button of control (WT) and transgenic line 9 (OX-*FaPRE1*) using *FaGAST1* and *FaGAST2* specific primers. Quantification is based on  $C_t$  values as described in Materials and Methods. The increase in the mRNA value was relative to the WT  $C_t$  value of each experiment, which was assigned an arbitrary value equal to unity. Mean values  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. Statistical significance with respect to the reference sample (WT) was determined by the Student's *t*-test: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## Microarray data

### *Functional analysis of the microarray*

When using BLASTX within Blast2Go with a  $1.0E^{-10}$  cut-off value to a total of 730 differentially expressed genes, GO terms were assigned to 434 sequences (59.45 %), while 296 (40.54 %) did not match any GO terms. This analysis enabled a global vision of the number of genes differentially expressed under each of the conditions studied, classified as biological processes, cellular components and molecular functions. The high number of non GO-annotated genes could be due to either a lack of homologous sequences and/or the presence of long non coding RNA in the population of analyzed genes.

Comparing all the microarrays datas, we could identify 4 cluster of genes according to their expression values (up- or down- regulated genes) when the gene *FaPRE1* was overexpressed (OX-*FaPRE1*) or silenced (*FaPRE1*-RNAi).

Sequence distribution at level 2 are summarized in pie charts in Additional files; Chapter 4; Additional figure 1. Overall, within biological processes, the most abundant categories were



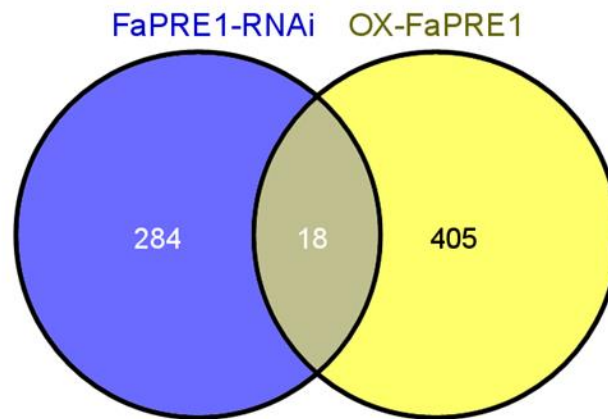
metabolic process (243 sequences; 55.99 %), cellular process (170 sequences; 39.17 %) and localization (39 sequences; 8.98 %). The most represented molecular functions were binding (278 sequences; 64.05 %), catalytic activity (219 sequences; 50.46 %) and nucleic acid binding transcription factor activity (23 sequences; 5.29 %) and a large proportion of sequence were associated with cell (56 sequences; 12.90 %), membrane (51 sequences; 11.75 %) and organelle (23 sequences; 5.29 %) as cellular compartment. Worth emphasize, GO enrichment analyses showed a high proportion of genes classified as nucleic acid binding transcription factor activity according to their molecular function present in the cluster formed by those genes down-regulated in *OX-FaPRE1* transgenic strawberry fruit receptacles (18 sequences of 23). According to cellular component analysis, subcellular location of *OX-FaPRE1*-related genes is mostly confined to membrane (32 of 84 sequences; 38.09 %) while those *FaPRE1*-RNAi-related genes are preferentially associated with cell (27 of 61 sequences; 44.26 %).

Afterwards, all of the genes that constitute a cluster were manually annotated and subsequently assigned to the different physiologic, metabolic and molecular processes potentially related to FaPRE1. We found enrichment for transcription factors-, protein metabolism-, transporter activity-, cell wall- and biotic stress-plant defense -related genes.

#### *Detection of differentially regulated genes*

The potential regulatory role played by FaPRE1 on the expression of the structural genes belonging to downstream unknown pathways in strawberry fruit receptacles, was assessed through transcriptomic studies. For them, the expression of *FaPRE1* gene was transiently down-regulated in fruit receptacle by RNAi approach and permanent overexpressed in transgenic lines. The analyzed transgenic fruits showed an important reduction in *FaPRE1* expression ranging between 88.3-99.5 % whereas no changes in *FaPRE1* expression were appreciated in control fruits. Fruit receptacles that presented a percentage of silencing above 99 % were used for transcriptomics analysis. On the other hand, overexpression values were determined by qRT-PCR in different tissues of adult plants of transgenic lines (e.g. leaves and flower buds). A custom-made oligo-based microarray platform representing 34775 putative genes from the *Fragaria* genome (FraGenomics35K) was used. Transcriptome analysis was carried out to compare gene expression profiles of transgenic transiently silenced *FaPRE1* fruits (*FaPRE1*-RNAi) against control fruits agroinfiltrated with the empty pFRN vector and permanent transgenic flower buds overexpressing *FaPRE1* (*OX-FaPRE1*) against control flower buds transformed with the empty pK7WG2.0 vector. The work focused on the most clearly up- and down-regulated genes by choosing a 2.0-fold cut off and a corrected *P*-value < 0.01. This microarray analysis revealed that only few transcripts were down- and/or up-regulated in both

experiments (Table 1). The overlap in genes differentially expressed in these two experiments was depicted with a two-way Venn diagram (Figure 15).



**Figure 15: Venn Diagram using all differentially expressed genes for *FaPRE1* gene silencing and overexpressing experiments.** VENNY online tool (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) was used for this purpose (Oliveros, JC. 2007).

The results showed that 707 genes were differentially expressed. More specifically, *FaPRE1* silencing regulated 302 (0.868 %) of the 34775 unigenes represented on the microarray slide. Among these, 132 (43.7 %) were up-regulated and 170 (56.3 %) were down-regulated (Additional files; Chapter 4; Additional table 2, Additional table 3). On the other hand, overexpression of *FaPRE1* led to the differential expression of 423 (1.216 %) genes when compared with the control distributed in 110 (26 %) up-regulated genes and 313 (74 %) down-regulated genes (Additional files; Chapter 4; Additional table 4, Additional table 5). The comparison of both conditions showed that only 18 genes (2.55 %) were commonly affected (Table 1). One of them was up-regulated under both experiments, 6 of 18 presented down-regulation under both conditions, while 11 genes showed differential pattern of regulation in the two experiments.

**Table 1: Genes commonly regulated under both experimental conditions:** A) silencing *FaPRE1* (*FaPRE1*-RNAi array), B) overexpression *FaPRE1* (OX-*FaPRE1* array).

ID gene	Annotation	<i>FaPRE1</i> -RNAi array	OX- <i>FaPRE1</i> array	Functional group
<i>gene28696</i>	brassinosteroid-regulated protein BRU1	■	■	Cell wall
<i>gene14081</i>	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase			Cell wall
<i>gene02631</i>	Xyloglucan glycosyltransferase 12			Cell wall
<i>gene29850</i>	UDP-glucuronate 4-epimerase 1			Cell wall
<i>gene10328</i>	Allene oxide cyclase (AOC)			Lipid metabolism
<i>gene15739</i>	Phosphatidic acid phosphatase-related protein			Lipid metabolism
<i>gene21247</i>	Monocopper oxidase-like protein SKS1			Redox related protein
<i>gene21825</i>	Sec14 cytosolic factor			Transporter activity
<i>gene07007</i>	Uncharacterized protein			Uncharacterized protein
<i>gene18189</i>	Uncharacterized protein			■
<i>gene12931</i>	Uncharacterized protein	Uncharacterized protein		
<i>gene01553</i>	phototropic-responsive NPH3-like protein	Photoreceptors and Phototropism		
<i>gene19242</i>	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	■	■	Amino acid metabolism
<i>gene23936</i>	septum-promoting GTP-binding protein 1-like			Cell division cycle
<i>gene18503</i>	SKP1-interacting partner 15			Protein metabolism
<i>gene18505</i>	SKP1-like protein			Protein metabolism
<i>gene28720</i>	WRKY transcription factor			Transcription factor
<i>gene04460</i>	amino acid transporter			Transporter activity

■ up-regulated (fold change > 2 ; p-value < 0,01)  
 ■ down-regulated (fold change < -2 ; p-value < 0,01)

Thus, the most interesting group of genes differentially regulated is constituted by 11 candidates, three of them remain uncharacterized according to NCBI data base (Table 1). Four out of these 11 belong to cell wall functional group identified as cell wall-modifying enzymes. *Gene28696* (brassinosteroid-regulated protein BRU1) and *gene02631*, both xyloglucan endotransglycosilases, have been characterized as cell wall enzymes that promote cell elongation in response to brassinosteroids (BRs) (Zurek *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1998; Müssig *et al.*, 2002). *Gene29850* (UDP-glucuronate 4-epimerase 1) is involved in the synthesis of the negatively charged monosaccharide that forms the backbone of pectic cell wall components (Usadel *et al.*, 2004) and *gene14081* (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase) is thought to be an important plant defense-related product in cell wall against fungal pathogens. Although these genes are down-regulated in fruits overexpressing *FaPRE1* gene, we have detected up-regulated cell wall-related genes in OX-*FaPRE1* fruits (Tables S5) that could be responsible of observed elongated phenotypes (Figure 9; Figure S4) and modified cell structure (Figure 10). Or conversely, by overexpression of *FaPRE1* a repressor of the cell wall genes is silenced with leading to a down-regulation of the cell wall-related genes and thereby elongated phenotype is stimulated by modifying of the cell wall.

It is noteworthy that two down-regulated genes included in the "cell elongation" functional group (*gene29570*, *ovate family protein* (AOF) and *gene21137*, *BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYLS 4* (*BIL4*)) have been detected when *FaPRE1* was overexpressed. These genes have been characterized in previous publications as transcriptional repressors of cell elongation in *A. thaliana* (Hackbusch *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Yamagami *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). AtOFP1 regulates secondary cell wall formation and suppress cell elongation in part by suppressing the expression of *AtGA20ox1* (Wang *et al.*, 2011) whereas AtBIL4 is a critical component of plant cell elongation occurring upon BR signaling (Yamagami *et al.*, 2009). Overexpressing *FaPRE1*, we detected a down-regulation of both transcriptional repressors (Additional files; Chapter 4; Additional table 4), promoting cell elongation simultaneously through two independent routes, placing *FaPRE1* on a crossroads. Strawberry transgenic lines showed elongated phenotypes in aerial organs such as crowns and petioles (Figure 8) and flower buds (Figure 12A-B).

Besides, it has been detected a large number of differentially regulated genes in our microarray platform, grouped into cell cycle division functional group (Additional files; Chapter 4; Additional table 2, Additional table 4). Published literature pointed out that BRs stimulate not only cell elongation, but also cell division (Fridman and Savaldi-Goldstein, 2013). This fact could involved *FaPRE1* with these cellular events through BRs signaling.

Highlights the large group of transcription factors whose expression is down-regulated due to overexpression of *FaPRE1* (Additional files; Chapter 4; Additional table 4). Despite being a large group, only 2 of the 31 down-regulated transcription factors are ripening-related receptacle-specific genes. *Gene31123* codes for a transcription elongation factor SPT6 whose homologous gene in human binds histone H3 and plays a key role in the regulation of transcription elongation and mRNA processing as well as enhances the transcription elongation by RNA polymerase II (RNAPII) and also promotes the activation of the myogenic gene program by entailing erasure of the repressive H3K27me3 epigenetic mark through stabilization of the chromatin interaction of the H3K27 demethylase KDM6A) (Endoh *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). *Gene28720* codes for a WRKY transcription factor, whose homolog in *Vitis amurensis* is a putative regulator of pathogen defense programs.

### **Yeast-two-hybrid screening**

To test if FaPRE1 interacts with some transcription factor or DNA-binding protein, we carried out yeast-two-hybrid experiments, by co-expressing a FaPRE1 fused to the GAL4 DNA-binding domain (BD) and an expressed red strawberry fruit cDNA library fused to the GAL4 DNA-activating domain (AD). Among the obtained transformants were identified by sequencing 10 putative partners presenting interaction with FaPRE1 (Table 2). Of particular interest are two genes (*gene09451* and *gene12417*) coding for DNA-topoisomerases. In *Arabidopsis*, *BIN4*, *gene12417* homologue, codes for a DNA-binding plant-specific protein that belongs to the topoisomerase VI complex, acting as chromatin remodeling complex in response to brassinosteroids (BRs) (Breuer *et al.*, 2007). *Arabidopsis bin4* mutants have reduced cell expansion and dwarf phenotype (Breuer *et al.*, 2007).

Previous self-activation test was carried out to evaluate self-activation property of FaPRE1. We did not find self-activation events under any of the conditions tested, so FaPRE1 under such conditions is not presented in the form of homodimers.

**Table 2: Yeast-two-hybrid screening.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**, 109-116) and its correspondence with the NCBI database.

www.strawberrygenome.org			NCBI		
ID	Species	Annotation	Accession	Species	Annotation
gene04617	<i>Fragaria vesca</i>	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase protein 3	XP_002311337	<i>Populus trichocarpa</i>	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase protein
gene11023	<i>Fragaria vesca</i>	ABC transporter I family member 10	EXB40973	<i>Morulus notabilis</i>	ABC transporter I family member
gene22974	<i>Fragaria vesca</i>	S-adenosylmethionine synthetase 2	AGV22114	<i>Betula luminifera</i>	S-adenosylmethionine synthetase 1
gene11411	<i>Fragaria vesca</i>	Graves disease carrier protein (GDC)	EXB38820	<i>Morulus notabilis</i>	Graves disease carrier protein (GDC)
gene09451	<i>Fragaria vesca</i>	DNA topoisomerase 2-beta	XP_003534157	<i>Glycine max</i>	nucleosome assembly protein 1;1
gene00282	<i>Fragaria vesca</i>	ADP-ribosylation factor 2	AGV54515	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ADP-ribosylation factor
gene12417	<i>Fragaria vesca</i>	Stress response protein NST1	XM_004307862	<i>Fragaria vesca</i>	DNA-binding protein BIN-4
gene12767	<i>Fragaria vesca</i>	Ubiquitin	XP_002318470	<i>Populus trichocarpa</i>	Ubiquitin
gene24981	<i>Fragaria vesca</i>	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	EXB75029	<i>Morulus notabilis</i>	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
gene02728	<i>Fragaria vesca</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha	NP_171957	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha

## Discussion

*FaPRE1* belongs to the atypical bHLH factors group (Figure 3; Additional files; Chapter 4; Additional table 1). Members of this group lack the basic region which is involved in DNA binding activity but keep the highly conserved HLH domain (Figure 1; Figure 2) Through of this domain, they interact with other factors regulating the expression of target genes by binding to promoter regions directly thanks to the basic domain of the bHLH factors or removing others atypical bHLH factors that act as inhibitors and allowing attachment of a third factors to the promoter of interest (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009; Carretero-Paulet *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012; Heang *et al.*, 2012; Ikeda *et al.*, 2012). Thus, complex regulatory mechanisms that act accurately in response to multiple external factors are established.

We found that *FaPRE1* is preferentially expressed in mature red receptacle (Figure 4A) with a spatio-temporal pattern of expression along development and ripening stages coincident with the typical curve of growth described in Moyano-Cañete *et al.* (2013) for “Camarosa” cultivar. This seems to indicate that the higher growth rates of strawberry receptacles coincides with largest increases in the amount of *FaPRE1* transcript. This evidence suggests a possible role of *FaPRE1* in the regulation of the size of the strawberry fruit receptacles. Moreover, transcript levels were negligible in achenes with respect to the receptacle (Figure 4B) and vegetative tissues, except for stolons and leaves (Figure 4C), providing further evidence that supports the possible role that *FaPRE1* could play in strawberry fruit receptacles. Thus, the overexpression of *FaPRE1* in transgenic plants produced obvious changes in the phenotype of those transgenic lines generated. Thereby, very elongated floral buds with respect to controls were observed (Figure 12A-B) and this phenotype was constant throughout later stages of development and maturation of strawberry receptacles (Additional files; Chapter 4; Additional figure 2). Histological analysis revealed that this increase of elongation was due to an increase in the area and perimeter of the inner marrow cells (Figure 13). These data seem to indicate that *FaPRE1* gene is related with changes in size and shape that strawberry fruit receptacles suffer along the development and ripening processes. Moreover, the fact that the *FaGAST1* and *FaGAST2* genes are also induced in parallel to *FaPRE1* support this idea (Figure 14) insomuch as both genes have been described as genes involved in the cell morphology and act synergistically in the final determination of the strawberry fruit size (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). Recent studies in our research group indicate that both *FaGAST1* and *FaGAST2* play an important role during fruit growth and ripening process, where their proteins seem to act synergistically in order to determine fruit size (Moyano-Cañete *et al.*, 2013). In this sense, both genes could express and act synergistically to ensure proper dose of GAST proteins, which is required for the correct cell volume and fruit size. Furthermore, overexpression of *FaGAST2* gene in strawberry fruit

receptacles decreased both the parenchymal cells and the fruit size. However, *FaPRE1* overexpression promotes *FaGAST1* and *FaGAST2* expression, possibly to offset the effect of *FaPRE1*. In like manner, ectopic *FaPRE1* overexpression affected to vegetative tissues phenotype from transgenic strawberry plants which presented an elongated phenotype as a result of increased elongation of petioles and crown (Figure 8). Thus, the pleiotropic phenotypes suggest that *FaPRE1* overexpression might regulate downstream and/or upstream targets of interest for further study.

*FaPRE1* expression is down-regulated by auxins, up-regulated by ABA and no-regulated by GA<sub>3</sub> in strawberry fruit receptacles (Figure 5). However, GA<sub>3</sub> modulates positively *FaPRE1* expression in vegetative tissues of strawberry plants (Figure 6). Taken together, these results suggest that, as in the case of other strawberry ripening-related genes, the *FaPRE1* gene expression could be regulated by both the ABA and auxin content of the fruit receptacle. This data also support the proposal of Perkins-Veazie (1995) and the findings described by Chai *et al.* (2011), Jia *et al.* (2011) and Medina-Puche *et al.* (2014). Besides, these data suggest that *FaPRE1* might play a role in regulating the activity of bHLH proteins acting downstream of these hormones or at the cross-talk of different signaling pathways. HLH proteins are promiscuous and can regulate different signaling pathways. Interestingly, *PRE1* was identified in *Arabidopsis* as a regulator of GA signaling given that the overexpressing lines were resistant to paclobutrazol, an inhibitor of GA biosynthesis (Lee *et al.*, 2006). In strawberry, we have demonstrated that exogenous treatments with GA<sub>3</sub> to *in vitro* plants lead to an increased expression of *FaPRE1* vegetative tissues and similar elongated phenotypes (Figure 6), as also shown by Lee *et al.* (2006). On the other hand, paclobutrazol treatments lead to a reduction of *FaPRE1* transcript and dwarf phenotypes (Figure 6). This indicates that *FaPRE1* might act downstream of the GA biosynthesis, leading to a final regulation of cell elongation in vegetative tissues of strawberry plants.

Based on sequence homology, *FaPRE1* was classified into subfamily 16 of bHLH, where are grouped the *ILI* and *PRE* members of rice and *Arabidopsis*, respectively (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) (Figure 3; Additional files; Chapter 4; Additional table 1). Overexpression of the *FaPRE1*-GFP translational fusion protein, in *Nicotiana benthamiana* leaves, showed that the protein was located within the nucleus (Figure 7) as expected from a transcription factor and confirming the putative localization of this protein that was deduced through bioinformatic analysis of its protein sequence (Figure 1). It has been reported that many members of subfamily 16, such as *Arabidopsis* *PRE1*, tomato *Style2.1* and rice *ILI1*, control the cell elongation and expansion in specific organs (Lee *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Thus, modification of tissue structure has been shown in previous studies in rice, where



overexpression of *ILI-1* produced increased lamina joint inclination (Zhang *et al.*, 2009). Histological analysis of transgenic plants overexpressing *FaPRE1* confirmed alteration of cell morphology and tissue structure in floral button (Figure 13), crown and root (Figure 10) indicating that this gene seems to have a similar behavior to other genes from the subfamily 16.

Many studies have demonstrated that the PRE family of HLH factors plays a key role in promoting cell elongation and plant growth downstream of not only environmental but also hormonal signals (Lee *et al.*, 2006; Hyun and Lee, 2006; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Mara *et al.*, 2010; Schlereth *et al.*, 2010). Several members of this family have been shown to interact with, through its conserved HLH domain, and inhibit atypical bHLH factors, such as IBH1 and AIFs (Hyun and Lee, 2006; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) to form non-DNA binding heterodimers (Carretero-Paulet *et al.*, 2010; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). PRE1 activates bHLH factors by dimerizing with another non-DNA binding atypical HLH factor (IBH1) that inhibits DNA binding activity of the bHLH factors (Bai *et al.*, 2012). This strategy provides an additional negative control point of regulation of multiple signals generating a complex interaction network. However, none bHLH could be identified through Y2H experiments. Our explanation for this is that *FaPRE1* is underrepresented in the population of mRNA of ripe red fruits and therefore it is difficult to obtain interactions between bHLH factors. Our proposal for future experiments is to conduct Y2H addressed approaches in strawberry against putative targets in line with previous publications in other organisms such as *Arabidopsis* and rice.

On the other hand, we identified two DNA-topoisomerases that interact with FaPRE1. One of them, DNA-binding protein BIN-4 (*gene12417*) that codes for a DNA-binding plant-specific protein, acts as an element of chromatin remodeling complex in response to BRs (Breuer *et al.*, 2007). *Arabidopsis bin4* mutants showed dwarf phenotypes and reduced cell expansion (Breuer *et al.*, 2007). This evidence putatively places to FaPRE1 in strawberry on routes regulated by BRs that control cell size. This relationship between FaPRE1 and BRs is consistent with the results observed in the microarray after silencing and overexpression of *FaPRE1* gene (Table 1; see *Detection of differentially regulated genes*). But also FaPRE1 regulates genes related to GAs (Table 1; see *Detection of differentially regulated genes*), so deeper functional experiments are needed to shed light on the regulatory role through BRs and GAs that FaPRE1 plays in the development and maturation of strawberry fruit receptacle.

# CONCLUSIONS

## CONCLUSIONS

## CONCLUSIONS

### CHAPTER 1

1. The strawberry *FaNCED1* gene shows significant homology of sequence with other *NCEDs* genes of higher plants involved in the biosynthesis of abscisic acid.
2. *FaNCED1* is the key enzyme in the biosynthesis of abscisic acid in strawberry fruit receptacles along development and ripening stages.
3. The content of abscisic acid in strawberry fruit receptacles can be modulated by different approaches.

### CHAPTER 2

4. The amount of abscisic acid in the strawberry fruit receptacle determine the trigger of the maturation, being the main hormone that regulates the ripening and the expression of those genes involved in this process.

### CHAPTER 3

5. *FaEOBII* is an R2R3 MYB transcription factor, homologous to *PhEOBII* from *Petunia hybrida*, capable of binding to MBSII cis-regulatory elements and trans-activate certain target promoters.
6. *FaEOBII* is an hormonal and ripening-related transcription factor that regulates, by a novel regulatory network, key structural genes of the phenylpropanoid pathway that are related to the eugenol biosynthesis in the strawberry fruit receptacle.
7. *FaEOBII* expression is hormonally regulated in a similar way to that of other strawberry ripening-related TFs
8. *FaEOBII* expression correlates with eugenol production in different strawberry plant tissues
9. In ripe receptacles, eugenol production is regulated by the interaction between *FaMYB10* and *FaEOBII*
10. *FvEGS2* and *FaEGS2* have different expression patterns that correlate with MBSII cis-regulatory elements in their promoters

### CHAPTER 4

11. *FaPRE1* is an atypical basic helix-loop-helix transcription regulator that shows a high homology of sequence with the six members of HLHs from *Arabidopsis thaliana* and other bHLHs of higher plants

## CONCLUSIONS

12. In strawberry fruit receptacles, *FaPRE1* expression is negatively regulated by auxins, positively by abscisic acid and non-regulated by gibberellic acid, whereas gibberellic acid induces *FaPRE1* expression in plant tissues
13. *FaPRE1* overexpression in strawberry plants increases the size of the aerial parts, but not the leaves, and affects chlorophyll and anthocyanins levels
14. *FaPRE1* overexpression alters the size and shape of the strawberry fruit receptacle cells and induces *FaGAST1* and *FaGAST2*, both genes involved in cell morphology
15. *FaPRE1* regulates several cell-wall related genes
16. *FaPRE1* regulates and interacts with genes under control of GAs and BRs, placing *FaPRE1* on a crosstalk.

## **REFERENCES**

## REFERENCES

## REFERENCES

- Abbasi A-R, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM** (2007) Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol* **143**: 1720-1738
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78
- Abeles FB, Takeda F** (1990) Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae* **42**: 269-275
- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J** (2004) Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science* **9**: 331-338
- Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177-181
- Agustí J, Zapater M, Iglesias DJ, Cercós M, Tadeo FR, Talón M** (2007) Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Science* **172**: 85-94
- Aharoni A, De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP** (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal* **28**: 319-332
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FWA, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ** (2004) Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell* **16**: 3110-3131
- Aharoni A, Keizer LC, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AM, De Vos RC, 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**: 647-662
- Aharoni A, Keizer LCP, Van Den Broeck HC, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RCH, O'Connell AP** (2002) 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, O'Connell AP** (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2073-2087
- Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB** (2002) Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS* **6**: 217-234
- Aharoni A, Vorst O** (2002) DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* **48**: 99-118
- Akhatou I, Fernández Recamales Á** (2014) Influence of cultivar and culture system on nutritional and organoleptic quality of strawberry. *J Sci Food Agric* **94**: 866-875
- Albani MC, Battley 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**: 2039-2055
- Alm R, Ekefjård A, Krogh M, Häkkinen J, Emanuelsson C** (2007) Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *J Proteome Res* **6**: 3011-3020
- Almeida JRM, D'Amico E, Preuss A, Carbone F, de Vos CHR, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG, Martens S, Rosati C** (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria xananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**: 61-71
- Alleva K, Marquez M, Villarreal N, Mut P, Bustamante C, Bellati J, Martínez G, Civello M, Amodio 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
- Amaya I, Osorio S, Martínez-Ferri E, Lima-Silva V, Doblaz VG, Fernández-Muñoz R, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V** (2014) Increased antioxidant capacity in tomato by ectopic expression of the strawberry D-galacturonate reductase gene. *Biotechnology Journal*: n/a-n/a



- 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. *Biotechnol J* **10**: 490-500
- Anterola AM, Jeon J-H, Davin LB, Lewis NG** (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **277**: 18272-18280
- Anttonen MJ, Hoppula KI, Nestby R, Verheul MJ, Karjalainen RO** (2006) Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing Environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *J Agric Food Chem* **54**: 2614-2620
- Aragüez I, Osorio S, Hoffmann T, Rambla JL, Medina-Escobar N, Granell A, Botella MÁ, Schwab W, Valpuesta V** (2013) Eugenol production in achenes and receptacles of strawberry fruits is catalyzed by synthases exhibiting distinct kinetics. *Plant Physiology* **163**: 946-958
- 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*. *J Agric Food Chem* **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 color. *Phytochemistry* **11**: 1139-1144
- Asif M, 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
- Aubert C, Pitrat M** (2006) Volatile Compounds in the Skin and Pulp of Queen Anne's Pocket Melon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8177-8182
- Bai M-Y, Fan M, Oh E, 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**: 4917-4929
- 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 of the Science of Food and Agriculture* **64**: 31-37
- Barceló M, El-Mansouri I, Mercado J, Quesada M, Pliego Alfaro F** (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**: 29-36
- Barritt BH, Shanks CH, Jr.** (1980) Breeding strawberries for resistance to the aphids *Chaetosiphon fragaefolii* and *C. thomasi*. *HortScience* **15**: 287-288
- Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ** (2014) Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **54**: 790-806
- Battey NH, Tooke F** (2002) Molecular control and variation in the floral transition. *Curr Opin Plant Biol* **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*. *Plant Journal* **39**: 366-380
- Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A** (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology* **135**: 1865-1878
- Ben-Arie R, Faust M** (1980) ATPase in ripening strawberries. *Phytochemistry* **19**: 1631-1636
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero J-L, Muñoz-Blanco J** (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* **54**: 633-645
- Benjamini YH, Yosef** (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological* **1**: 289-300
- Benjamins R, Scheres B** (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 443-465

- Berger MF, Bulyk ML** (2009) Universal protein-binding microarrays for the comprehensive characterization of the DNA-binding specificities of transcription factors. *Nat Protoc* **4**: 393-411
- Bernard P, Couturier M** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735-745
- Bernard P, Kézdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M** (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* **234**: 534-541
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U** (2004) Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **135**: 254-265
- Bitto E, Bingman CA, Bittova L, Houston NL, Boston RS, Fox BG, Phillips GN** (2009) X-ray structure of ILL2, an auxin-conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* **74**: 61-71
- Blanco-Portales R, López-Raéz JA, Bellido ML, Moyano E, Dorado G, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (2004) A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Molecular Biology* **55**: 763-780
- Blanco-Portales R, Medina-Escobar N, López-Raéz JA, González-Reyes JA, Villalba JM, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* **53**: 1723-1734
- Bombarely A, Merchante C, Csukasi F, Cruz-Rus E, Caballero JL, Medina-Escobar N, Blanco-Portales R, Botella MA, Muñoz-Blanco J, Sánchez-Sevilla JF, 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
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ** (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* **382**: 769-781
- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C** (2010) Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J Exp Bot* **61**: 3615-3625
- 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
- Bradford MM** (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
- Breuer C, Stacey NJ, West CE, Zhao Y, Chory J, Tsukaya H, Azumi Y, Maxwell A, Roberts K, Sugimoto-Shirasu K** (2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3655-3668
- Brummell DA, Harpster MH** (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**: 311-340
- Brummell DA, Harpster MH, Dunsmuir P** (1999) Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology* **39**: 161-169
- Bruzzo S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, Scarfi S, Millo E, De Flora A, Zocchi E** (2007) Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5759-5764
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D** (2003) The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnol J* **1**: 3-22
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB** (1999) Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. *Plant Journal* **17**: 427-431
- 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

- BUTCHER DN, CLARK JA, LENTON JR** (1990) Gibberellins and the Growth of Excised Tomato Roots: Comparison of gib-1 Mutant and Wild Type and Responses to Applied GA3 and 2S, 3S Paclobutrazol. *Journal of Experimental Botany* **41**: 715-722
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180
- Cardozo T, Pagano M** (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 739-751
- Carrari F, Fernie AR** (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J Exp Bot* **57**: 1883-1897
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martínez-García JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL** (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology* **153**: 1398-1412
- Casanova E, Trillas MI, Moysset L, Vainstein A** (2005) Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol Adv* **23**: 3-39
- Casañal A, Zander U, Dupeux F, Valpuesta V, Marquez JA** (2013) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **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. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 35322-35332
- Castelain M, Le Hir R, 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. *Physiologia Plantarum* **145**: 450-460
- Castellarin SD, Matthews MA, Di Gaspero G, Gambetta GA** (2007) Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* **227**: 101-112
- 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
- Cazzonelli CI, Pogson BJ** (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**: 266-274
- Cevik V, Ryder C, Popovich A, Manning K, King G, Seymour G** (2010) A FRUITFULL-like gene is associated with genetic variation for fruit flesh firmness in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes* **6**: 271-279
- Cipriani G, Testolin R** (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Fragaria*. *Molecular Ecology Notes* **4**: 366-368
- Civello PM, Martinez GA, Chaves AR, Anon MC** (1995) Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 2596-2601
- Civello PM, Powell AL, Sabehat A, Bennett AB** (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* **121**: 1273-1280
- Colquhoun TA, Clark DG** (2011) Unraveling the regulation of floral fragrance biosynthesis. *Plant Signal Behav* **6**: 378-381
- Colquhoun TA, Kim JY, Wedde AE, Levin LA, Schmitt KC, Schuurink RC, Clark DG** (2011) PhMYB4 fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia x hybrida* through PhC4H. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1133-1143
- Colquhoun TA, Schimmel BCJ, Kim JY, Reinhardt D, Cline K, Clark DG** (2010) A petunia chorismate mutase specialized for the production of floral volatiles. *Plant Journal* **61**: 145-155
- Colquhoun TA, Verdonk JC, Schimmel BCJ, Tieman DM, Underwood BA, Clark DG** (2010) *Petunia* floral volatile benzenoid/phenylpropanoid genes are regulated in a similar manner. *Phytochemistry* **71**: 158-167
- 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 Physiol Biochem* **70**: 433-444
- 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

- Corpet F** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890
- Cosgrove DJ, Li ZC** (1993) Role of Expansin in Cell Enlargement of Oat Coleoptiles (Analysis of Developmental Gradients and Photocontrol). *Plant Physiol* **103**: 1321-1328
- Crecente-Campo J, Nunes-Damaceno M, Romero-Rodríguez MA, Vázquez-Odériz ML** (2012) Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria* and *Ananassa Duch*, cv Selva). *Journal of Food Composition and Analysis* **28**: 23-30
- Creelman RA, Bell E, Mullet JE** (1992) Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic Acid biosynthesis. *Plant Physiology* **99**: 1258-1260
- Cruz-Rus E, Amaya I, Sánchez-Sevilla JF, Botella MA, Valpuesta V** (2011) Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4191-4201
- Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, Kitamura J, Giavalisco P, Nakajima M, Fernie AR, Rathjen JP, Botella MA, Valpuesta V, Medina-Escobar N** (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist* **191**: 376-390
- Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, Hoffmann T, Sinz Q, Ring L, Studart-Wittkowski C, Luis Caballero J, Schwab W, Munoz-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
- Cutler A, Krochko J** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* **4**: 472-478
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 651-679
- Chai Y-M, Jia H-F, Li C-L, Dong Q-H, Shen Y-Y** (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* **62**: 5079-5089
- 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**: 217
- Chen J-y, Liu D-j, Jiang Y-m, Zhao M-l, Shan W, Kuang J-f, Lu W-j** (2011) Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS ONE* **6**: e24649
- Chen K-Y, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD** (2007) Changes in Regulation of a Transcription Factor Lead to Autogamy in Cultivated Tomatoes. *Science* **318**: 643-645
- Chen N, Xu Y, Wang X, DU C, DU J, Yuan M, Xu Z, Chong K** (2011) OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell Environ* **34**: 52-64
- 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
- Cherian S, Figueroa CR, Nair H** (2014) 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *J Exp Bot* **65**: 4705-4722
- Chernys JT, Zeevaart JA** (2000) Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* **124**: 343-353
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J-P, Latché 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
- Chinnusamy V, Zhu J-K** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 133-139
- Cho W, Stahelin RV** (2006) Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1761**: 838-849
- Chou K-C, Shen H-B** (2010) Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS ONE* **5**: e11335
- Christie PJ** (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol* **179**: 3085-3094
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E** (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biology (Stuttgart)* **8**: 314-325

- Chung M-Y, Vrebalov J, Alba R, Lee J, McQuinn R, Chung J-D, Klein P, Giovannoni J** (2010) A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SIAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J* **64**: 936-947
- Dal Cin V, Tieman DM, Tohge T, McQuinn R, de Vos RCH, Osorio S, Schmelz EA, Taylor MG, Smits-Kroon MT, Schuurink RC, Haring MA, Giovannoni J, Fernie AR, Klee HJ** (2011) Identification of genes in the phenylalanine metabolic pathway by ectopic expression of a MYB transcription factor in tomato fruit. *Plant Cell* **23**: 2738-2753
- 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
- Davies C, Boss PK, Robinson SP** (1997) Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiol* **115**: 1155-1161
- de Folter S, Immink RGH, 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. *Plant Cell* **17**: 1424-1433
- de la Fuente JI, Amaya I, Castillejo C, Sánchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V** (2006) The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2401-2411
- de Silva K, Laska B, Brown C, Sederoff HW, Khodakovskaya M** (2011) Arabidopsis thaliana calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): a novel repressor of abiotic stress response. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2679-2689
- Demmig-Adams B, Adams WW** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**: 21-26
- Dennis FG** (1984) Fruit development. *Physiological basis of crop growth and development*. M.B. Tesar, (Eds.) Madison: American Society of Agronomy, pp: 265-288
- Denoyes-Rothan B, Guérin G, Lerceteau-Köhler E, Risser G** (2005) Inheritance of Resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* **95**: 405-412
- Dexter R, Qualley A, Kish CM, Ma CJ, Koeduka T, Nagegowda DA, Dudareva N, Pichersky E, Clark D** (2007) Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. *Plant Journal* **49**: 265-275
- Dirinck PJ, De Pooter HL, Willaert GA, Schamp NM** (1981) Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**: 316-321
- Dong C-H, Zolman BK, Bartel B, Lee B-h, Stevenson B, Agarwal M, Zhu J-K** (2009) Disruption of Arabidopsis CHY1 reveals an important role of metabolic status in plant cold stress signaling. *Mol Plant* **2**: 59-72
- Dotto MC, Martínez GA, Civello PM** (2006) Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiol Biochem* **44**: 301-307
- Douillard C, Guichard E** (1990) The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): Characterisation of some cultivars and influence of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **50**: 517-531
- Dragišić Maksimović J, Poledica M, Mutavdžić D, Mojović M, Radivojević D, Milivojević J** (2015) Variation in nutritional quality and chemical composition of fresh strawberry fruit: combined effect of cultivar and storage. *Plant Foods Hum Nutr* **70**: 77-84
- Dreher T, Poovaiah B** (1982) Changes in auxin content during development in strawberry fruits. *In HORTSCIENCE*, Vol 17. AMER SOC HORTICULTURAL SCIENCE 701 NORTH SAINT ASAPH STREET, ALEXANDRIA, VA 22314-1998, pp 475-475
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang X-F, Yang W-J, Wu Y-M, Huang Y-B, Tang Y-X** (2009) Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Moscow)* **74**: 1-11
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **15**: 573-581
- El-Sharkawy I, Manríquez D, Flores F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech J-C** (2005) Functional Characterization of a Melon Alcohol Acyl-transferase Gene Family Involved in the Biosynthesis of Ester Volatiles. Identification of the Crucial Role of a Threonine Residue for Enzyme Activity\*. *Plant Molecular Biology* **59**: 345-362
- El-Sharkawy I, Mila I, Bouzayen M, Jayasankar S** (2010) Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. *J Exp Bot* **61**: 1761-1770
- El Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA** (1996) Shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Rep* **15**: 642-646

- Elitzur T, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Goldschmidt EE, Friedman H** (2010) The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1523-1535
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**: 1005-1016
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978-984
- Encinas-Villarejo S, Maldonado AM, Amil-Ruiz F, de los Santos B, Romero F, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (2009) Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fa WRKY1 and Arabidopsis At WRKY75 proteins in resistance. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3043-3065
- Endoh M, Zhu W, Hasegawa J, Watanabe H, Kim D-K, Aida M, Inukai N, Narita T, Yamada T, Furuya A, Sato H, Yamaguchi Y, Mandal SS, Reinberg D, Wada T, Handa H** (2004) Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 3324-3336
- Erendorfer F** (1983) Sinopsis del reino vegetal. En *Tratado de Botánica*, Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A.F.W., Von Denffer, D., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. y Ziegler, H. (Eds.). Barcelona: Omega, pp: 854-856
- Eriksson T, Hibbs MS, Yoder AD, Delwiche CF, Donoghue MJ** (2003) The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the trnL/F region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Sciences*, **164**: 197-211
- Eshghi S, Tafazoli E** (2007) Possible role of cytokinins in flower induction in strawberry. *American Journal Plant Physiology*, **2**: 167-174
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P, Lamb C** (2009) Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* **150**: 1750-1761
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal* **66**: 94-116
- Ferrarese L, Trainotti L, Moretto P, Polverino de Laureto P, Rascio N, Casadoro G** (1995) Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. *Plant Molecular Biology* **29**: 735-747
- Ferrer J** (1997) Las células de los tejidos vegetales. Ed. Vedral
- Ferreira RM, Viña SZ, Mugridge A, Chaves AR** (2007) Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. *Scientia Horticulturae* **112**: 27-32
- Filippone MP, Diaz Ricci J, Mamaní de Marchese A, Fariás RN, Castagnaro A** (1999) Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters*, **459**: 115-118
- Finkelstein RR, Gibson SI** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 26-32
- Fischer TC, Mirbeth B, Rentsch J, Sutter C, Ring L, Flachowsky H, Habegger R, Hoffmann T, Hanke M-V, Schwab W** (2014) Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Phytol* **201**: 440-451
- Folta KM, Staton M, Stewart PJ, Jung S, Bies DH, Jesdurai C, Main D** (2005) Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*). *BMC Plant Biol* **5**: 12
- Fonseca S, Hackler Jr L, Zvara Á, Ferreira SI, Baldé A, Dudits D, Pais MS, Puskás LG** (2004) Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. *Plant Science* **167**: 457-469
- Forney CF, Breen PJ** (1985) Dry matter partitioning and assimilation in fruiting and deblossomed strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **110**: 181-185
- Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R** (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 2367-2372
- Fridman Y, Savaldi-Goldstein S** (2013) Brassinosteroids in growth control: How, when and where. *Plant Science* **209**: 24-31
- Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, Furuya M, Chory J** (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**: 1445-1456

- Fujisawa M, Nakano T, Shima Y, Ito Y** (2013) A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *Plant Cell* **25**: 371-386
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 436-442
- Galpaz N, Wang Q, Menda N, Zamir D, Hirschberg J** (2008) Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *The Plant Journal* **53**: 717-730
- 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 Signal Behav* **4**: 766-768
- 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. *J Exp Bot* **64**: 1837-1848
- Gelvin SB** (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 16-37, table of contents
- Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M** (2015) Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct* **6**: 1386-1398
- Gil-Ariza DJ, Amaya I, Botella MA, Blanco JM, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Sánchez-Sevilla JF** (2006) EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria×ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes* **6**: 1195-1197
- Giovannoni J** (2001) MOLECULAR BIOLOGY OF FRUIT MATURATION AND RIPENING. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 725-749
- Giovannoni JJ** (2004) Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell Online* **16**: S170-S180
- Giovannoni JJ** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 283-289
- Given NK, Venis MA, Gierson D** (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* **174**: 402-406
- Given NK, Venis MA, Gierson D** (1988) Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity and Anthocyanin Synthesis in Ripening Strawberry Fruit. *Journal of Plant Physiology* **133**: 25-30
- Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pérez-Pérez J, Oliveros JC, Lorenzo O, Solano R** (2011) Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant Journal* **66**: 700-711
- 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 P, Zhang J, Li H, Yang C, Zhang C, Zhang X, Khurram Z, Zhang Y, Wang T, Fei Z, Ye Z** (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3563-3575
- Gong Z, 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
- Green A** (1971) Soft Fruits. In *The Biochemistry of Fruits and their Products*. A.C. Hulme, ed. London: Academic Press, pp: 375-409
- Griesser M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Munoz-Blanco J, Schwab W** (2008) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2611-2625
- Grove CA, De Masi F, Barrasa MI, Newburger DE, Alkema MJ, Bulyk ML, Walhout AJM** (2009) A multiparameter network reveals extensive divergence between *C. elegans* bHLH transcription factors. *Cell* **138**: 314-327
- Gu X, Chen Y, Gao Z, Qiao Y, Wang X** (2015) Transcription factors and anthocyanin genes related to low-temperature tolerance in rd29A:RdreB1BI transgenic strawberry. *Plant Physiol Biochem* **89**: 31-43

- Gu X, Gao Z, Zhuang W, Qiao Y, Wang X, Mi L, Zhang Z, Lin Z** (2013) Comparative proteomic analysis of rd29A:RdreB1BI transgenic and non-transgenic strawberries exposed to low temperature. *J Plant Physiol* **170**: 696-706
- Gulen H, Eris A** (2004) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* **166**: 739-744
- Guo W-J, Ho T-H, David Ho T-H** (2008) An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. *Plant Physiol* **147**: 1710-1722
- Guttridge CG, Jarrett JM, Stinchcombe GR, Curtis PJ** (1977) Chemical induction of local reddening in strawberry fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **28**: 243-246
- Guzmán P** (2012) The prolific ATL family of RING-H2 ubiquitin ligases. *Plant Signal Behav* **7**: 1014-1021
- Hackbusch J, Richter K, Müller J, Salamini F, Uhrig JF** (2005) A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4908-4912
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Törrönen AR** (2000) Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2960-2965
- Halbwirth H, Puhl I, Haas U, Jezik K, Treutter D, Stich K** (2006) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *J Agric Food Chem* **54**: 1479-1485
- Hancock JF** (1999) Strawberries. CABI Pub.
- Hancock JF, Luby JJ, Dale A, Callow PW, Serçe S, El-Shiek A** (2002) Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: Inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* **126**: 177-184
- Hannum SM** (2004) Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**: 1-17
- Harker FR, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G** (2010) Texture of Fresh Fruit. *In Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp 121-224
- Harpster MH, Brummell DA, Dunsmuir P** (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1, 4-beta-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology* **118**: 1307-1316
- Harpster MH, Lee KY, Dunsmuir P** (1997) Isolation and characterization of a gene encoding endo-beta-1,4-glucanase from pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Molecular Biology* **33**: 47-59
- Harrison EP, McQueen-Mason SJ, Manning K** (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J Exp Bot* **52**: 1437-1446
- 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
- Haymes KM, Henken B, Davis TM, van de Weg WE** (1997) Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf1) in the cultivated strawberry. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 1097-1101
- Heang D, Sassa H** (2012) Antagonistic actions of HLH/bHLH proteins are involved in grain length and weight in rice. *PLoS ONE* **7**: e31325
- 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*). *Physiologia Plantarum* **130**: 280-289
- Hemphill R, Martin LH** (1992) Microwave oven-drying method for determining soluble solids in strawberries. *HortScience*, **27**: 1326
- Hernandez JM, Feller A, Morohashi K, Frame K, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 17222-17227
- Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaaja J, Saluz H-P, Haenel F, Eilers M** (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Molecular Cell* **10**: 509-521
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* **27**: 297-300
- 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
- Hirayama T, Shinozaki K** (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science* **12**: 343-351
- Hirner AA, Veit S, Seitz HU** (2001) Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-A-irradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Sci* **161**: 315-322
- Hiwasa K, Rose JKC, Nakano R, Inaba A, Kubo Y** (2003) Differential expression of seven alpha-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiol Plant* **117**: 564-572
- Hjernø K, Alm R, Canbäck B, Matthiesen R, Trajkovski K, Björk L, Roepstorff P, Emanuelsson C** (2006) Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* **6**: 1574-1587
- Hobson GE** (1993). *Maduración del fruto*. En *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcón-Bieto J. y Talón M., (Eds.). Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, pp: 4463-4478
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- 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
- Hoffmann T, Kurtzer R, Skowranek K, Kiessling P, Fridman E, Pichersky E, Schwab W** (2011) Metabolic engineering in strawberry fruit uncovers a dormant biosynthetic pathway. *Metabolic Engineering* **13**: 527-531
- Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM** (1994) The Virulence System of *Agrobacterium Tumefaciens*. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 157-181
- Hou Z-X, Huang W-D** (2005) Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apices during floral induction. *Planta* **222**: 678-687
- Houde M, Dallaire S, N'Dong D, Sarhan F** (2004) Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol J* **2**: 381-387
- Hua C, Linling L, Feng X, Yan W, Honghui Y, Conghua W, Shaobing W, Zhiqin L, Juan H, Yuping W, Shuiyuan C, Fuliang C** (2013) Expression patterns of an isoflavone reductase-like gene and its possible roles in secondary metabolism in *Ginkgo biloba*. *Plant Cell Rep* **32**: 637-650
- Hua Z, Vierstra RD** (2011) The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 299-334
- Hua Z, Zou C, Shiu S-H, Vierstra RD** (2011) Phylogenetic comparison of F-Box (FBX) gene superfamily within the plant kingdom reveals divergent evolutionary histories indicative of genomic drift. *PLoS ONE* **6**: e16219
- Hubbard NL, Pharr DM, Huber SC** (1991) Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* **82**: 191-196
- Huber DJ** (1984) Strawberry Fruit Softening: The Potential Roles of Polyuronides and Hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**: 1310-1315
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephanians SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS** (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology* **19**: 342-347
- Husaini AM, Abdin MZ** (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science* **174**: 446-455
- Hytönen T, Elomaa P, Moritz T, Junttila O** (2009) Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *BMC Plant Biol* **9**: 18
- Hyun Y, Lee I** (2006) KIDARI, encoding a non-DNA Binding bHLH protein, represses light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **61**: 283-296
- Ibdah M, Pichersky E** (2009) *Arabidopsis* Chy1 null mutants are deficient in benzoic acid-containing glucosinolates in the seeds. *Plant Biol (Stuttg)* **11**: 574-581
- Ikeda M, Fujiwara S, Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2012) A Triantagonistic Basic Helix-Loop-Helix System Regulates Cell Elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **24**: 4917-4929
- Itkin M, Seybold H, Breitel D, Rogachev I, Meir S, Aharoni A** (2009) TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J* **60**: 1081-1095

- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **27**: 325-333
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology* **123**: 553-562
- 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-S, Araki T, Denoyes B, Foucher F** (2012) The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant J* **69**: 116-125
- Jaakola L, Poole M, Jones MO, Kämäräinen-Karppinen T, Koskimäki JJ, Hohtola A, Häggman H, Fraser PD, Manning K, King GJ, Thomson H, Seymour GB** (2010) A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol* **153**: 1619-1629
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Jia H-F, Chai Y-M, Li C-L, Lu D, Luo J-J, Qin L, Shen Y-Y** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* **157**: 188-199
- Jia H, Wang Y, Sun M, Li B, Han Y, Zhao Y, Li X, Ding N, Li C, Ji W, Jia W** (2013) Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist* **198**: 453-465
- Jiajun L, Yuhua L, Guodong D, Hanping D, Mingqin D** (2005) A Natural Pentaploid Strawberry Genotype from the Changbai Mountains in Northeast China. *HortScience* **40**: 1194-1195
- Jiang Y, Joyce D** (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* **39**: 171-174
- 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-Nevado 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 Physiol* **128**: 751-759
- Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P** (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**: 751-758
- Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW** (2004) Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* **18**: 2573-2580
- John O-A, Yamaki S** (1994) Sugar Content, Compartmentation, and Efflux in Strawberry Tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119**: 1024-1028
- Jordán MJ, Tandon K, Shaw PE, Goodner KL** (2001) Aromatic Profile of Aqueous Banana Essence and Banana Fruit by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography–Olfactometry (GC-O). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4813-4817
- Jung S, Cho I, Sosinski B, Abbott A, Main D** (2010) Comparative genomic sequence analysis of strawberry and other rosids reveals significant microsynteny. *BMC Res Notes* **3**: 168
- Kafkas E, Koşar M, Paydaş S, Kafkas S, Başer KHC** (2007) Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. *Food Chemistry* **100**: 1229-1236
- Kalt W, Prange RK, Lidster PD** (1993) Postharvest color development of strawberries: Influence of maturity, temperature and light. *Canadian Journal of Plant Science* **73**: 541-548
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-195
- Karlova R, Chapman N, David K, Angenent GC, Seymour GB, de Maagd RA** (2014) Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J Exp Bot* **65**: 4527-4541

- Karlova R, Rosin FM, Busscher-Lange J, Parapunova V, Do PT, Fernie AR, Fraser PD, Baxter C, Angenent GC, de Maagd RA** (2011) Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* **23**: 923-941
- Karlsson AL, Alm R, Ekstrand B, Fjellkner-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
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Okuda H, Yano M** (2006) The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2153-2164
- Keller E, Cosgrove DJ** (1995) Expansins in growing tomato leaves. *Plant J* **8**: 795-802
- Kende H, Zeevaart J** (1997) The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210
- Keniry A, Hopkins CJ, Jewell E, Morrison B, Spangenberg GC, Edwards D, Batley J** (2006) Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria* × *ananassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes* **6**: 319-322
- Khan M, Xu H, Hepworth SR** (2014) BLADE-ON-PETIOLE genes: setting boundaries in development and defense. *Plant Sci* **215-216**: 157-171
- Klee HJ, Giovannoni JJ** (2011) Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *Annual Review of Genetics* **45**: 41-59
- Knee M, Sargent JA, Osborne DJ** (1977) Cell Wall Metabolism in Developing Strawberry Fruits. *Journal of Experimental Botany* **28**: 377-396
- Koeduka T, Fridman E, Gang DR, Vassão DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP, Baiga TJ, Dudareva N, Pichersky E** (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 10128-10133
- Koeduka T, Suzuki S, Iijima Y, Ohnishi T, Suzuki H, Watanabe B, Shibata D, Umezawa T, Pichersky E, Hiratake J** (2013) Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **436**: 73-78
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**: 383-396
- Kong Y, Pena MJ, Renna L, Avci U, Pattathil S, Tuomivaara ST, Li X, Reiter W-D, Brandizzi F, Hahn MG, Darvill AG, York WS, O'Neill M** (2015) Galactose-Depleted Xyloglucan is Dysfunctional and Leads to Dwarfism in Arabidopsis. *Plant Physiol*
- 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
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeeckens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B** (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 263-276
- Kumar R, Tyagi AK, Sharma AK** (2011) Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Mol Genet Genomics* **285**: 245-260
- Kurokura T, Inaba Y, Sugiyama N** (2006) Histone H4 gene expression and morphological changes on shoot apices of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) during floral induction. *Scientia Horticulturae* **110**: 192-197
- Landi L, Mezzetti B** (2006) TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep* **25**: 281-288
- Landy A** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**: 913-949
- Lange PR, Eastmond PJ, Madagan K, Graham IA** (2004) An Arabidopsis mutant disrupted in valine catabolism is also compromised in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *FEBS Lett* **571**: 147-153
- 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
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Bio/Technology* **9**: 963-967

- Lee RC, Hrmova M, Burton RA, Lahnstein J, Fincher GB** (2003) Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha -L-arabinofuranosidase and beta -D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. *J Biol Chem* **278**: 5377-5387
- Lee S, Lee S, Yang K-Y, Kim Y-M, Park S-Y, Kim SY, Soh M-S** (2006) Overexpression of PRE1 and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 591-600
- Leeuwen W, Hagendoorn MM, Ruttink T, Poecke R, Plas LW, Krol A** (2000) The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 143-144
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A** (2006) Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant Journal* **45**: 309-319
- Lei H-J, Yuan H-Z, Liu Y, Guo X-W, Liao X, Liu L-L, Wang Q, Li T-H** (2013) Identification and characterization of FaSOC1, a homolog of SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 from strawberry. *Gene* **531**: 158-167
- Leng P, Yuan B, Guo Y** (2014) The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J Exp Bot* **65**: 4577-4588
- Leshem YY, Pinchasov Y** (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* **51**: 1471-1473
- Lewers KS, Styan SMN, Hokanson SC, Bassil NV** (2005) Strawberry GenBank-derived and Genomic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers and Their Utility with Strawberry, Blackberry, and Red and Black Raspberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**: 102-115
- Li C, Jia H, Chai Y, Shen Y** (2011) Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: a model for non-climacteric fruit ripening. *Plant Signal Behav* **6**: 1950-1953
- Li C, Liu Z, Zhang Q, Wang R, Xiao L, Ma H, Chong K, Xu Y** (2012) SKP1 is involved in abscisic acid signalling to regulate seed germination, stomatal opening and root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **35**: 952-965
- Li J, Yang X, Wang Y, Li X, Gao Z, Pei M, Chen Z, Qu L-J, Gu H** (2006) Two groups of MYB transcription factors share a motif which enhances trans-activation activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**: 1155-1163
- Li J, Zhang Q-Y, Gao Z-H, Wang F, Duan K, Ye Z-W, Gao Q-H** (2013) Genome-wide identification and comparative expression analysis of NBS-LRR-encoding genes upon *Colletotrichum gloeosporioides* infection in two ecotypes of *Fragaria vesca*. *Gene* **527**: 215-227
- 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. *J Proteomics* **94**: 219-239
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S** (2003) Expansins and cell growth. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 603-610
- Lim CW, Lee SC** (2015) *Arabidopsis* abscisic acid receptors play an important role in disease resistance. *Plant Molecular Biology* **88**: 313-324
- Lin-Wang K, McGhie TK, Wang M, Liu Y, Warren B, Storey R, Espley RV, Allan AC** (2014) Engineering the anthocyanin regulatory complex of strawberry (*Fragaria vesca*). *Front Plant Sci* **5**: 651
- Lin Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K, Grierson D** (2008) A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant J* **55**: 301-310
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A** (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 341-350
- Liu D-j, Chen J-y, Lu W-j** (2011) Expression and regulation of the early auxin-responsive Aux/IAA genes during strawberry fruit development. *Mol Biol Rep* **38**: 1187-1193
- Liu G, Ren G, Guirgis A, Thornburg RW** (2009) The MYB305 transcription factor regulates expression of nectarin genes in the ornamental tobacco floral nectary. *Plant Cell* **21**: 2672-2687
- Liu H, Xie W-F, Zhang L, Valpuesta V, Ye Z-W, Gao Q-H, Duan K** (2014) Auxin Biosynthesis by the YUCCA6 Flavin Monooxygenase Gene in Woodland Strawberry. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**: 350-363
- Liu K, Kang B-C, Jiang H, Moore SL, Li H, Watkins CB, Setter TL, Jahn MM** (2005) A GH3-like gene, CcGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Molecular Biology* **58**: 447-464

- Liu L, Jia C, Zhang M, Chen D, Chen S, Guo R, Guo D, Wang Q** (2014) Ectopic expression of a BZR1-1D transcription factor in brassinosteroid signalling enhances carotenoid accumulation and fruit quality attributes in tomato. *Plant Biotechnol J* **12**: 105-115
- Lopes-da-Silva F, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C** (2002) Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology* **214**: 248-253
- Lopez AP, Portales RB, López-Ráez JA, Medina-Escobar N, Blanco JM, Franco AR** (2006) Characterization of a strawberry late-expressed and fruit-specific peptide methionine sulphoxide reductase. *Physiologia Plantarum* **126**: 129-139
- Loughrin JH, Kasperbauer MJ** (2002) Aroma of fresh strawberries is enhanced by ripening over red versus black mulch. *J Agric Food Chem* **50**: 161-165
- Loyola J, Verdugo I, González E, Casaretto JA, Ruiz-Lara S** (2012) Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biol (Stuttg)* **14**: 149-156
- Lunkenbein S, Bellido M, Aharoni A, Salentijn EMJ, Kaldenhoff R, Coiner HA, Muñoz-Blanco J, Schwab W** (2006) Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiology* **140**: 1047-1058
- Lüthje S, Meisrimler C-N, Hopff D, Möller B** (2011) Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry* **72**: 1124-1135
- Llop-Tous I, Domínguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M** (1999) Characterization of two divergent endo-beta-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* **119**: 1415-1422
- Llop-Tous I, Domínguez-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. *J Exp Bot* **53**: 2283-2285
- 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
- Mabberley DJ** (2002) *Potentilla* and *Fragaria* (Rosaceae) reunited. *Telopea*, **9**(4):793-801
- MÄKinen KK, SÖDerlIng EVA** (1980) A QUANTITATIVE STUDY OF MANNITOL, SORBITOL, XYLITOL, AND XYLOSE IN WILD BERRIES AND COMMERCIAL FRUITS. *Journal of Food Science* **45**: 367-371
- Mancinelli AL, Schwartz OM** (1984) The Photoregulation of Anthocyanin Synthesis IX. The Photosensitivity of the Response in Dark and Light-Grown Tomato Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **25**: 93-105
- 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**: 622-631
- Manríquez D, El-Sharkawy I, Flores FB, El-Yahyaoui F, Regad F, Bouzayen M, Latché A, Pech J-C** (2006) Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Molecular Biology* **61**: 675-685
- Mara CD, Huang T, Irish VF** (2010) The Arabidopsis floral homeotic proteins APETALA3 and PISTILLATA negatively regulate the BANQUO genes implicated in light signaling. *Plant Cell* **22**: 690-702
- Martel C, Vrebalov J, Tafelmeyer P, Giovannoni JJ** (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol* **157**: 1568-1579
- 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 Physiol Biochem* **42**: 89-96
- Martinez M, Abraham Z, Gambardella M, Echaide M, Carbonero P, Diaz I** (2005) The strawberry gene *Cyfl* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *J Exp Bot* **56**: 1821-1829

- Martínez Zamora MG, Castagnaro AP, Díaz Ricci JC** (2004) Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries. *Mol Genet Genomics* **272**: 480-487
- Mascarell-Creus A, Cañizares J, Vilarrasa-Blasi J, Mora-García S, Blanca J, Gonzalez-Ibeas D, Saladié M, Roig C, Deleu W, Picó-Silvent B, López-Bigas N, Aranda MA, Garcia-Mas J, Nuez F, Puigdomènech P, Caño-Delgado AI** (2009) An oligo-based microarray offers novel transcriptomic approaches for the analysis of pathogen resistance and fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genomics* **10**: 467
- Massari ME, Murre C** (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 429-440
- Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C** (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**: 58-65
- Mathews H, Wagoner W, Kellogg 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
- McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K** (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front Plant Sci* **4**: 79
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ** (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **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, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology* **34**: 867-877
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology* **36**: 33-42
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (1997) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Anal Biochem* **248**: 288-296
- Medina-Puche L, Cumplido-Laso G, Amil-Ruiz F, Hoffmann T, Ring L, Rodríguez-Franco A, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2014) MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* **65**: 401-417
- Medina-Puche L, Molina-Hidalgo FJ, Boersma M, Schuurink RC, López-Vidriero I, Solano R, Franco-Zorrilla J-M, Caballero JL, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J** (2015) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Eugenol Production in Ripe Strawberry Fruit Receptacles. *Plant Physiology* **168**: 598-614
- Mercado JA, Trainotti L, Jiménez-Bermúdez L, Santiago-Doménech N, Posé S, Donolli R, Barceló M, Casadoro G, Pliego-Alfaro F, Quesada MA** (2010) Evaluation of the role of the endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase gene FaEG3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* **55**: 8-14
- Merchante C, Vallarino JG, Osorio S, Aragüez I, Villarreal N, Ariza MT, Martínez GA, Medina-Escobar N, Civello MP, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V** (2013) Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4421-4439
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A** (2004) The defH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* **4**: 4
- Min T, Kasahara H, Bedgar DL, Youn B, Lawrence PK, Gang DR, Halls SC, Park H, Hilsenbeck JL, Davin LB, Lewis NG, Kang C** (2003) Crystal structures of pinoresinol-laricresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 50714-50723
- Minic Z, Rihouey C, Do CT, Lerouge P, Jouanin L** (2004) Purification and characterization of enzymes exhibiting beta-D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 867-878
- Miosic S, Thill J, Milosevic M, Gosch C, Pober S, Molitor C, Ejaz S, Rompel A, Stich K, Halbwirth H** (2014) Dihydroflavonol 4-reductase genes encode enzymes with contrasting substrate specificity and show divergent gene expression profiles in *Fragaria* species. *PLoS ONE* **9**: e112707

- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X** (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis. *Science* **312**: 264-266
- Molina-Hidalgo FJ, Franco AR, Villatoro C, Medina-Puche L, Mercado JA, Hidalgo MA, Monfort A, Luis Caballero J, Munoz-Blanco J, Blanco-Portales R** (2013) The strawberry (*Fragaria ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1471-1483
- Molina-Hidalgo FJ, Medina-Puche L, Gelis S, Ramos J, Sabir F, Soveral G, Prista C, Iglesias-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
- Monfort A, Vilanova S, Davis TM, ArÚS P** (2006) A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria* × *ananassa*. *Molecular Ecology Notes* **6**: 197-200
- 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 Sci* **160**: 355-360
- Mouhu K, Hytönen T, Foltá K, Rantanen M, Paulin L, Auvinen P, Elomaa P** (2009) Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biol* **9**: 122
- Mouhu K, Kurokura T, Koskela EA, Albert VA, Elomaa P, Hytönen T** (2013) The *Fragaria vesca* homolog of suppressor of overexpression of constans1 represses flowering and promotes vegetative growth. *Plant Cell* **25**: 3296-3310
- Moyano-Canete E, Bellido ML, Garcia-Caparrós N, Medina-Puche L, Amil-Ruiz F, Gonzalez-Reyes JA, Caballero JL, Munoz-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 and Cell Physiology* **54**: 218-236
- Moyano E, Encinas-Villarejo S, López-Ráez JA, Redondo-Nevado J, Blanco-Portales 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, Martínez-García JF, Martín C** (1996) Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* **8**: 1519-1532
- 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. *J Exp Bot* **56**: 101-112
- Mukhopadhyay D, Riezman H** (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**: 201-205
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* **210**: 925-931
- Munné-Bosch S, Schwarz K, Alegre L** (1999) Enhanced Formation of alpha-Tocopherol and Highly Oxidized Abietane Diterpenes in Water-Stressed Rosemary Plants. *Plant Physiol* **121**: 1047-1052
- Muñoz C, Hoffmann T, Escobar NM, Ludemann F, Botella MA, Valpuesta V, Schwab W** (2010) The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3**: 113-124
- Muñoz C, Sánchez-Sevilla JF, Botella MA, Hoffmann T, Schwab W, Valpuesta V** (2011) Polyphenol composition in the ripe fruits of *Fragaria* species and transcriptional analyses of key genes in the pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 12598-12604
- 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
- Müssig C, Fischer S, Altmann T** (2002) Brassinosteroid-Regulated Gene Expression. *Plant Physiology* **129**: 1241-1251
- Mussinan CJ, Walradt JP** (1975) Organic acids from fresh California strawberries. *J Agric Food Chem* **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. *Physiol Plant* **132**: 538-551
- Nakamura A, Shimada H, Masuda T, Ohta H, Takamiya K** (2001) Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Lett* **506**: 61-64
- 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 x ananassa*. *J Plant Physiol* **177**: 60-66
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 165-185
- Nardi C, Escudero C, Villarreal N, Martínez G, Civello PM** (2013) The carbohydrate-binding module of *Fragaria x ananassa* expansin 2 (CBM-FaExp2) binds to cell wall polysaccharides and decreases cell wall enzyme activities "in vitro". *J Plant Res* **126**: 151-159
- Nardi CF, Villarreal NM, Rossi FR, Martínez S, Martínez GA, Civello PM** (2015) Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism. *Plant Molecular Biology* **88**: 101-117
- NDong C, Ouellet F, Houde M, Sarhan F** (1997) Gene expression during cold acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiol* **38**: 863-870
- Neal GE** (1965) Changes occurring in the cell walls of strawberries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **16**: 604-611
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RS, Crosby WL, Stushnoff C** (1990) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* **9**: 293-298
- Nilsson O, Moritz T, Sundberg B, Sandberg G, Olsson O** (1996) Expression of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC Gene in a Deciduous Forest Tree Alters Growth and Development and Leads to Stem Fasciation. *Plant Physiol* **112**: 493-502
- Nitsch JP** (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, **37**: 211-215
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR** (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14162-14167
- Nogata Y, Ohta H, Voragen AGJ** (1993) Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* **34**: 617-620
- Nunes MCN, Brecht JK, Morais AMMB, Sargent SA** (2006) Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 180-190
- Ofosu-Anim J, Kanayama Y, Yamaki S** (1996) Sugar uptake into strawberry fruit is stimulated by abscisic acid and indoleacetic acid. *Physiologia Plantarum* **97**: 169-174
- Oh M-H, Romanow WG, Smith RC, Zamski E, Sasse J, Clouse SD** (1998) Soybean BRU1 Encodes a Functional Xyloglucan Endotransglycosylase That is Highly Expressed in Inner Epicotyl Tissues during Brassinosteroid-Promoted Elongation. *Plant and Cell Physiology* **39**: 124-130
- Olszewski N, Sun T-P, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**: S61-80
- 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
- Opazo MC, Figueroa CR, Henríquez J, Herrera R, Bruno C, Valenzuela PDT, Moya-León MA** (2010) Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Sci* **179**: 479-488
- Opazo MC, Lizana R, Pimentel P, Herrera R, Moya-León MA** (2013) Changes in the mRNA abundance of FcXTH1 and FcXTH2 promoted by hormonal treatments of *Fragaria chiloensis* fruit. *Postharvest Biology and Technology* **77**: 28-34
- Oritani T, Kiyota H** (2003) Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Nat Prod Rep* **20**: 414-425
- Ornelas-Paz JdJ, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, Pérez-Martínez JD, Escalante-Minakata MdP, 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**: 372-381



- Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, Dalla Rizza M, Mezzetti B, Ruggieri S** (2001) Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline-containing factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *J Biol Chem* **276**: 21578-21584
- Ortiz-Serrano P, Gil JV** (2009) Quantitative Comparison of Free and Bound Volatiles of Two Commercial Tomato Cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 1106-1114
- Osorio S, Bombarely A, Giavalisco P, Usadel B, Stephens C, Aragüez I, Medina-Escobar N, Botella MA, Fernie AR, Valpuesta V** (2011) Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defence and development of the fruit. *J Exp Bot* **62**: 2855-2873
- Osorio S, Castillejo C, Quesada MA, Medina-Escobar N, Brownsey GJ, Suau R, Heredia A, Botella MA, Valpuesta V** (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J* **54**: 43-55
- 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, van der Valk H, Salentijn EMJ** (2006) Antisense down-regulation of strawberry endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening. *Plant Science* **171**: 640-646
- Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N** (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Biosci* **25**: 291-299
- Paniagua C, Posé S, Morris VJ, Kirby AR, Quesada MA, Mercado JA** (2014) Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany* **114**: 1375-1383
- Paolucci F, Robbins MP, Passeri V, Hauck B, Morris P, Rubini A, Arcioni S, Damiani F** (2011) The strawberry transcription factor FaMYB1 inhibits the biosynthesis of proanthocyanidins in *Lotus corniculatus* leaves. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1189-1200
- Park J-I, Lee Y-K, Chung W-I, Lee I-H, Choi J-H, Lee W-M, Ezura H, Lee S-P, Kim I-J** (2006) Modification of Sugar Composition in Strawberry Fruit by Antisense Suppression of an ADP-glucose Pyrophosphorylase. *Molecular Breeding* **17**: 269-279
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X** (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **12**: 1484-1495
- Pasay C, Mounsey K, Stevenson G, Davis R, Arlian L, Morgan M, Vyszynski-Moher D, Andrews K, McCarthy J** (2010) Acaricidal activity of eugenol based compounds against scabies mites. *PLoS ONE* **5**: e12079
- 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 Rep* **21**: 397-401
- Perkins-Veazie P** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Review*, **17**: 267-297
- Perkins-Veazie P** (2010) Growth and Ripening of Strawberry Fruit. *In Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp 267-297
- 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 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
- 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
- Petroski MD, Deshaies RJ** (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 9-20
- Pillet J, Yu H-W, Chambers AH, Whitaker VM, Folta KM** (2015) Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *Journal of Experimental Botany*, **66**: 4455-4467
- Pincemail J, Kevers C, Tabart J, Defraigne J-O, Dommes J** (2012) Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *J Food Sci* **77**: C205-210
- Pires N, Dolan L** (2010) Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 862-874

- Pombo MA, Martínez GA, Civello PM** (2011) Cloning of FaPAL6 gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation. *Plant Sci* **181**: 111-118
- 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
- Powell ALT, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB, Labavitch JM** (2000) Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 942-950
- Prouse MB, Campbell MM** (2012) The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 67-77
- Pyysalo T, Honkanen E, Hirvi T** (1979) Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated berries, *Fragaria* .times. ananassa cv Senga Sengana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 19-22
- Qin X, Yang SH, Kepsel AC, Schwartz SH, Zeevaart JAD** (2008) Evidence for abscisic acid biosynthesis in *Cuscuta reflexa*, a parasitic plant lacking neoxanthin. *Plant Physiology* **147**: 816-822
- Qin X, Zeevaart JA** (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 15354-15361
- Qin X, Zeevaart JAD** (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**: 544-551
- Quesada MA, Blanco-Portales R, Posé S, García-Gago JA, Jiménez-Bermúdez S, Muñoz-Serrano A, Caballero JL, Pliego-Alfaro F, Mercado JA, Muñoz-Blanco J** (2009) Antisense 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
- Rabino I, Mancinelli AL** (1986) Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiology* **81**: 922-924
- 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
- Rantanen M, Kurokura T, Jiang P, Mouhu K, Hytönen T** (2015) Strawberry homologue of terminal flower1 integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering. *Plant J* **82**: 163-173
- Rantanen M, Kurokura T, Mouhu K, Pinho P, Tetri E, Halonen L, Palonen P, Elomaa P, Hytönen T** (2014) Light quality regulates flowering in FvFT1/FvTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Front Plant Sci* **5**: 271
- Reddy AS, Jena PK, Mukherjee SK, Poovaiiah BW** (1990) Molecular cloning of cDNAs for auxin-induced mRNAs and developmental expression of the auxin-inducible genes. *Plant Molecular Biology* **14**: 643-653
- Reddy AS, Poovaiiah BW** (1990) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene. *Plant Molecular Biology* **14**: 127-136
- Reddy VS, Reddy ASN** (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* **65**: 1745-1776
- 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
- Ring L, Yeh S-Y, 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 Physiol* **163**: 43-60
- Rock CD, Zeevaart JA** (1990) Abscisic (ABA)-Aldehyde Is a Precursor to, and 1',4'-trans-ABA-Diol a Catabolite of, ABA in Apple. *Plant Physiol* **93**: 915-923
- Rodrigo M-J, Alquezar B, Zacarías L** (2006) Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under

- stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany* **57**: 633-643
- Rodriguez L, Gonzalez-Guzman M, Diaz M, Rodrigues A, Izquierdo-Garcia AC, Peirats-Llobet M, Fernandez MA, Antoni R, Fernandez D, Marquez JA, Mulet JM, Albert A, Rodriguez PL** (2014) C2-domain abscisic acid-related proteins mediate the interaction of PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors with the plasma membrane and regulate abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 4802-4820
- Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodríguez-Concepción M, Martínez-García JF** (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO Journal* **26**: 4756-4767
- Rosli HG, Civello PM, Martínez GA** (2004) Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol Biochem* **42**: 823-831
- Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Aïnouche A, Aïnouche ML, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B** (2009) Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* **51**: 515-530
- Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M** (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO Journal* **13**: 128-137
- 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 JKC** (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol* **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. *Physiologia Plantarum* **118**: 571-578
- Salvatierra A, Pimentel P, Moya-León MA, Herrera R** (2013) Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry* **90**: 25-36
- Schaart JG, Dubos C, Romero De La Fuente I, van Houwelingen AMML, de Vos RCH, Jonker HH, Xu W, Routaboul J-M, Lepiniec L, Bovy AG** (2013) Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *New Phytologist* **197**: 454-467
- Schieberle P, Hofmann T** (1997) Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 227-232
- Schlereth A, Möller B, Liu W, Kientz M, Flipse J, Rademacher EH, Schmid M, Jürgens G, Weijers D** (2010) MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature* **464**: 913-916
- Schuurink RC, Haring MA, Clark DG** (2006) Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends Plant Sci* **11**: 20-25
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* **54**: 712-732
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR** (1997) Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Schwieterman ML, Colquhoun TA, Jaworski EA, Bartoshuk LM, Gilbert JL, Tieman DM, Odabasi AZ, Moskowitz HR, Folta KM, Klee HJ, Sims CA, Whitaker VM, Clark DG** (2014) Strawberry flavor: diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLoS ONE* **9**: e88446
- Seeram NP** (2008) Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* **56**: 627-629
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K** (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 296-302
- Seo M, Koshiba T** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 41-48
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL** (2007) Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol* **145**: 246-257
- Seutter von Loetzen C, Schweimer K, Schwab W, Rösch P, Hartl-Spiegelhauer O** (2012) Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Bioscience Reports* **32**: 567-575

- Seymour GB, Chapman NH, Chew BL, Rose JKC** (2013) Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnol J* **11**: 269-278
- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C** (2013) Fruit Development and Ripening. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 219-241
- 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
- Seymour GB TJ, Tucker GA** (1993) *Biochemistry of Fruit Ripening*. London, Chapman & Hall: 442
- Shang Y, Lee MM, Li J, Nam KH** (2011) Characterization of cp3 reveals a new bri1 allele, bri1-120, and the importance of the LRR domain of BRI1 mediating BR signaling. *BMC Plant Biology* **11**: 8
- Sharp RE, LeNoble ME** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 33-37
- Shaw LM, McIntyre CL, Gresshoff PM, Xue G-P** (2009) Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Funct Integr Genomics* **9**: 485-498
- Shin B, Choi G, Yi H, Yang S, Cho I, Kim J, Lee S, Paek N-C, Kim J-H, Song P-S, Choi G** (2002) AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant Journal* **30**: 23-32
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**: 221-227
- Shkolnik D, Bar-Zvi D** (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in *Arabidopsis* by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J* **6**: 368-378
- Showalter AM, Keppler B, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR** (2010) A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol* **153**: 485-513
- 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, Ruiz Rojas JJ, 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, Lopez Girona E, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**: 109-116
- Shuman S** (1991) Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *J Biol Chem* **266**: 11372-11379
- Singsaas EL, Lerdaun M, Winter K, Sharkey TD** (1997) Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiol* **115**: 1413-1420
- Souleyre EJF, Marshall SDG, Oakeshott JG, Russell RJ, Plummer KM, Newcomb RD** (2011) Biochemical characterisation of MdCXE1, a carboxylesterase from apple that is expressed during fruit ripening. *Phytochemistry* **72**: 564-571
- Spitzer-Rimon B, Farhi M, Albo B, Cna'ani A, Ben Zvi MM, Masci T, Edelbaum O, Yu Y, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A** (2012) The R2R3-MYB-like regulatory factor EOBI, acting downstream of EOBI, regulates scent production by activating ODO1 and structural scent-related genes in petunia. *Plant Cell* **24**: 5089-5105
- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N-K, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A** (2010) EOBI, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. *Plant Cell* **22**: 1961-1976
- 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
- Spolaore S, Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G** (2003) Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo-beta-1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. *Journal of Experimental Botany* **54**: 271-277
- Staswick PE** (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol* **150**: 1310-1321

- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W** (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616-627
- Stutte GW, Darnell RL** (1987) A non-destructive developmental index for strawberry. *HortScience*, **22**: 218-221
- Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4741-4750
- 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
- Takezawa D, Komatsu K, Sakata Y** (2011) ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *J Plant Res* **124**: 437-453
- Tan B-C, Joseph LM, Deng W-T, Liu L, Li Q-B, Cline K, McCarty DR** (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**: 44-56
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JA, McCarty DR** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12235-12240
- Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, Shimatani Z, Ohtake M, Nomura T, Jiang C-J, Dubouzet JG, Kikuchi S, Sekimoto H, Yokota T, Asami T, Kamakura T, Mori M** (2009) BRASSINOSTEROID UPREGULATED1, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice. *Plant Physiology* **151**: 669-680
- Tesniere C, Pradal M, El-Kereamy A, Torregrosa L, Chatelet P, Roustan J-P, Chervin C** (2004) Involvement of ethylene signalling in a non-climacteric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2235-2240
- 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 Environ* **29**: 993-1001
- Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A, Taylor IB** (2000) Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **42**: 833-845
- Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB** (2000) Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant Journal* **23**: 363-374
- Thulasiram HV, Erickson HK, Poulter CD** (2007) Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science* **316**: 73-76
- 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
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T** (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533-543
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH** (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**: 1749-1770
- 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, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G** (1999) A novel E-type endo- $\beta$ -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Molecular Biology* **40**: 323-332
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CHR, Capanoglu E, Bovy A, Battino M** (2008) Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem* **56**: 696-704
- Uimari A, Strommer J** (1997) Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant Journal* **12**: 1273-1284
- Ulrich D, Komes D, Olbricht K, Hoberg E** (2007) Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**: 1185-1196
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2009) Characterization of the ABA-

- regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. *Plant Journal* **57**: 1065-1078
- Usadel B, Schlüter U, Mølhøj M, Gipmans M, Verma R, Kossmann J, Reiter W-D, Pauly M** (2004) Identification and characterization of a UDP-D-glucuronate 4-epimerase in Arabidopsis. *FEBS Letters* **569**: 327-331
- Valdivia ER, Chevalier D, Sampedro J, Taylor I, Niederhuth CE, Walker JC** (2012) DVL genes play a role in the coordination of socket cell recruitment and differentiation. *J Exp Bot* **63**: 1405-1412
- Valério L, De Meyer M, Penel C, Dunand C** (2004) Expression analysis of the Arabidopsis peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* **65**: 1331-1342
- Vallarino JG, Osorio S, Bombarely A, Casañal A, Cruz-Rus E, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I, Giavalisco P, Fernie AR, Botella MA, Valpuesta V** (2015) Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytol*
- Van Moerkercke A, Haring MA, Schuurink RC** (2011) The transcription factor EMISSION OF BENZENOIDES II activates the MYB ODORANT1 promoter at a MYB binding site specific for fragrant petunias. *Plant Journal* **67**: 917-928
- Veluthambi K, Poovaiah BW** (1984) Auxin-regulated polypeptide changes at different stages of strawberry fruit development. *Plant Physiol* **75**: 349-353
- Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC** (2005) ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* **17**: 1612-1624
- Verdonk JC, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC** (2003) Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* **62**: 997-1008
- Verslues PE, Zhu J-K** (2007) New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 447-452
- Vilanova S, Sargent DJ, Arús P, Monfort A** (2008) Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: Prunus (the stone fruits) and Fragaria (the strawberry). *BMC Plant Biol* **8**: 67
- Villarreal NM, Bustamante CA, Civello PM, Martínez GA** (2010) Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**: 683-689
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF** (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**: 1781-1789
- Voća S, Zlabur JS, Dobričević N, Jakobek L, Seruga M, Galić A, Pliستیć S** (2014) Variation in the bioactive compound content at three ripening stages of strawberry fruit. *Molecules* **19**: 10370-10385
- 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. *Plant Journal* **33**: 949-956
- Vranová E, Coman D, Gruissem W** (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* **5**: 318-333
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J, Irish VF** (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *Plant Cell* **21**: 3041-3062
- Wada H, Matthews MA, Shackel KA** (2009) Seasonal pattern of apoplastic solute accumulation and loss of cell turgor during ripening of Vitis vinifera fruit under field conditions. *J Exp Bot* **60**: 1773-1781
- Wang AH, Zare H, Mousavi K, Wang C, Moravec CE, Sirotkin HI, Ge K, Gutierrez-Cruz G, Sartorelli V** (2013) The histone chaperone Spt6 coordinates histone H3K27 demethylation and myogenesis. *EMBO J* **32**: 1075-1086
- Wang H, Tian C-e, Duan J, Wu K** (2008) Research progresses on GH3s, one family of primary auxin-responsive genes. *Plant Growth Regulation* **56**: 225-232
- Wang H, Zhu Y, Fujioka S, Asami T, Li J, Li J** (2009) Regulation of Arabidopsis brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *Plant Cell* **21**: 3781-3791
- Wang S, Chang Y, Guo J, Chen J-G** (2007) Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *Plant Journal* **50**: 858-872
- Wang S, Chang Y, Guo J, Zeng Q, Ellis BE, Chen J-G** (2011) Arabidopsis ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. *PLoS ONE* **6**: e23896

- Wang SY, Chen C-T, Wang CY, Chen P** (2007) Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *J Agric Food Chem* **55**: 8269-8274
- Wang SY, Lin HS** (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* **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
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Wechter WP, Levi A, Harris KR, Davis AR, Fei Z, Katzir N, Giovannoni JJ, Salman-Minkov A, Hernandez A, Thimmapuram J, Tadmor Y, Portnoy V, Trebitsh T** (2008) Gene expression in developing watermelon fruit. *BMC Genomics* **9**: 275
- 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
- Weigel D, Glazebrook J** (2006) In planta transformation of Arabidopsis. *CSH Protoc* **2006**
- Weiner JJ, Peterson FC, Volkman BF, Cutler SR** (2010) Structural and functional insights into core ABA signaling. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 495-502
- Wen F, Qin T, Wang Y, Dong W, Zhang A, Tan M, Jiang M** (2014) OsHK3 is a crucial regulator of abscisic acid signaling involved in antioxidant defense in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*
- Wen J, Lease KA, Walker JC** (2004) DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. *Plant J* **37**: 668-677
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369
- White PJ** (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1995-2000
- 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
- Willems AR, Schwab M, Tyers M** (2004) A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 133-170
- Woodward JR** (1972) Physical and chemical changes in developing strawberry fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **23**: 465-473
- 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, cell1. *Planta* **214**: 11-21
- Wrolstad RE, Shallenberger RS** (1981) Free sugars and sorbitol in fruits a compilation from the literature. *Journal of the Association Off. Analytical Chemistry*, **64**: 91-103
- Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1996) Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiol* **111**: 765-772
- Xie M, Chen J-W, Qin Q-P, Jiang G-H, Sun C-B, Zhang H-Q, Xu H-X** (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 (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology)* **33**: 213-218
- Xiong L, Zhu J-K** (2003) Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* **133**: 29-36
- Xu P, Cai W** (2014) RAN1 is involved in plant cold resistance and development in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* **65**: 3277-3287
- Xu W, Peng H, Yang T, Whitaker B, Huang L, Sun J, Chen P** (2014) Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol Biochem* **82**: 289-298
- Yamagami A, Nakazawa M, Matsui M, Tujimoto M, Sakuta M, Asami T, Nakano T** (2009) Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signaling. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**: 415-421
- Yanef A, Sigaut L, Marquez M, Alleva K, Pietrasanta LI, Amodeo G** (2014) Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 231-236
- Yang J, Guo Z** (2007) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (SgNCED1) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **26**: 1383-1390

- Yarnell SH** (1929) Notes on the Somatic Chromosomes of the Seven-Chromosome Group of *Fragaria*. *Genetics* **14**: 78-84
- Yeh S-Y, Huang F-C, Hoffmann T, Mayershofer M, Schwab W** (2014) FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Front Plant Sci* **5**: 518
- Yubero-Serrano E-M, Moyano E, Medina-Escobar N, Muñoz-Blanco J, Caballero J-L** (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* **54**: 1865-1877
- Zabetakis I, Holden MA** (1997) Strawberry Flavour: Analysis and Biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**: 421-434
- Zang A, Xu X, Neill S, Cai W** (2010) Overexpression of OsRAN2 in rice and Arabidopsis renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **61**: 777-789
- Zebrowska J, Hortyński J, Cholewa T, Honcz K** (2006) Resistance to *Verticillium dahliae* (Kleb.) in the strawberry breeding lines. *Commun Agric Appl Biol Sci* **71**: 1031-1036
- Zeevaart JAD, Creelman RA** (1988) Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 439-473
- Zhang D, Aravind L** (2010) Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene* **469**: 18-30
- Zhang L-Y, Bai M-Y, Wu J, Zhu J-Y, Wang H, Zhang Z, Wang W, Sun Y, Zhao J, Sun X, Yang H, Xu Y, Kim S-H, Fujioka S, Lin W-H, Chong K, Lu T, Wang Z-Y** (2009) Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3767-3780
- Zhang M, Yuan B, Leng P** (2009) Cloning of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene and the role of ABA on fruit ripening. *Plant Signal Behav* **4**: 460-463
- 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
- Zhang Y, Li B, Huai D, Zhou Y, Kliebenstein DJ** (2015) The conserved transcription factors, MYB115 and MYB118, control expression of the newly evolved benzoyloxy glucosinolate pathway in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **6**: 343
- 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. *J Plant Physiol* **164**: 68-77
- Zhang Z-L, Shin M, Zou X, Huang J, Ho T-hD, Shen QJ** (2009) A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells. *Plant Molecular Biology* **70**: 139-151
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP** (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703-709
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song C-P, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu J-K, Hasegawa PM, Bressan RA** (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* **14**: 3009-3028
- Zolman BK, Monroe-Augustus M, Thompson B, Hawes JW, Krukenberg KA, Matsuda SP, Bartel B** (2001) *chyl1*, an Arabidopsis mutant with impaired beta-oxidation, is defective in a peroxisomal beta-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *J Biol Chem* **276**: 31037-31046
- Zorrilla-Fontanesi Y, Rambla J-L, 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. *Clin Exp Allergy* **36**: 666-675
- Zuker A, Tzfira T, Scovel G, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Vainstein A** (2001) RolC transgenic carnation with improved horticultural traits: quantitative and qualitative analysis of greenhouse-grown plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 13-18
- Zurek DM, Clouse SD** (1994) Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiology* **104**: 161-170





## **ADDITIONAL FILES**



## ADDITIONAL FILES

## SUMMARY GENERAL METHODS

## Additional table 1.

**Gene expression values of different housekeeping genes obtained by qRT-PCR analysis.**

Experiment A: throughout the development and ripening of strawberry fruit. Experiment B: in vegetative tissues against strawberry red fruit. Experiment C: in de-achened G2 fruits against control G2 fruits. Reactions normalized using the Ct value corresponding to a strawberry interspacer 26S-18S gene for quantification as described in Materials and Methods. Ct values used as reference were assigned an arbitrary value equal to unity. The increase in mRNA value was relative to the receptacle G1-Ct value for experiment A, to the receptacle R-Ct value for experiment B and to the control G2-fruits-Ct for experiment C. G1: small-sized green fruits; G2: middle-sized green fruits; G3: full-sized green fruits; W: white fruits; R: full-ripe red fruits.

<i>QRT-PCR Analysis</i>								
Housekeeping genes	Experiment A					Experiment B Vegetative tissues vs Red fruits	Experiment C De-achened G2 fruits vs G2 fruits	
	G1	G2	G3	W	R			
<i>C11G1RB</i>	1.15	0.92	1.21	1.1	0.99	0.98	1.09	
<i>C13A2R</i>	1.06	1.2	1.15	0.9	1.19	1.13	0.99	
<i>C13H1RA</i>	1.22	0.98	0.97	1.3	1.09	0.98	1.02	
<i>C13F7R</i>	0.97	1.15	1.27	0.9	0.98	1.12	1.02	
<i>C23B5R</i>	1.01	1.07	1.3	1.2	1.19	0.97	1.03	
<i>C32H7R</i>	0.99	0.98	1.25	1.2	1.4	1.01	1.02	
<i>C31H3R</i>	1.12	0.97	1.31	1.4	0.99	0.98	0.99	
<i>C13E12R</i>	0.98	1.25	1.3	0.9	1.24	1.11	0.98	
<i>Interspacer 26S-18S</i>	1.01	0.99	1.1	1.0	0.98	1.02	1.03	

## CHAPTER 2

### **Additional table 1.**

**Complete list of deregulated genes during fruit ripening.** The data provide correspond to the list of strawberry genes whose expression is modified from green immature to red ripe fruit receptacles. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

### **Additional table 2.**

**Complete list of genes deregulated after NDGA treatment.** The data provide correspond to the list of strawberry genes whose expression is modified after NDGA treatment respect to untreated control fruits. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

### **Additional table 3.**

**Complete list of genes deregulated after removal of achenes.** The data provide correspond to the list of strawberry genes whose expression is modified after reducing auxin content in strawberry fruit receptacles by removing achenes respect to control fruits. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

### **Additional table 4.**

**Complete list of differential gene expression in red ripe strawberry fruit receptacles respect to vegetative tissues.** Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

**Additional table 5.**  
**Validation of microarray data by qRT-PCR.**

Gene ID	Ripening			ABA		
	Microarray		qRT-PCR (relative expression values; up)	Microarray		qRT-PCR (relative expression values; down)
	fold	p-value		fold	p-value	
FaNCED1 (gene30616)	3.322 up	2,62E-03	11.911 ± 1.873	3.406 down	8,00E-06	5.169 ± 0.385
FaMYB10 (gene31413)	417.84 up	3,79E-04	149.897 ± 38.984	5.241 down	5,67E-06	8.78 ± 1.534
FaAAT2 (gene07931)	30.671 up	3,84E-04	81.367 ± 9.357	5.471 down	3,24E-06	6.876 ± 0.954
FaRGlyase (gene31030)	25.988 up	9,80E-04	52 ± 21.555	3.511 down	1,24E-05	7.846 ± 0.524
FaNIP1;2 (gene23793)	7.836 up	4,76E-04	40.168 ± 2.687	5.010 down	7,96E-06	10.357 ± 1.287
FaEOBII (gene28435)	25.213 up	1,57E-03	56.3 ± 3.412	4.173 down	4,93E-04	8.674 ± 0.657
DOF (gene32526)	35.854 up	2,62E-03	74.357 ± 6.461	3.533 down	1,42E-05	3.23 ± 0.199
FaPL (gene17555)	4.059 up	1,11E-03	26.698 ± 3.327	2.003 down	3,50E-05	4.657 ± 0.846
FaPG1 (gene19241)	3.205 up	1,45E-03	21.688 ± 3.117	2.453 down	3,14E-05	5.087 ± 0.931
PME (gene17889)	5.545 up	8,30E-04	33.687 ± 2.841	2.640 down	3,65E-05	5.113 ± 0.412
FaQR (gene28406)	29.607 up	3,79E-04	63.218 ± 5.006	1.979 down	1,40E-04	4.006 ± 0.299
FaPRE1 (gene30478)	6.539 up	3,66E-03	45.137 ± 3.621	3.995 down	6,98E-06	6.328 ± 0.801
FaHMGC <sub>o</sub> A-Red (gene13004)	3.45 up	1,61E-03	3.97 ± 0.231	2.278 down	2,15E-04	5.065 ± 0.348
FaDXPs (gene20709)	6.192 up	3,66E-04	13.53 ± 0.829	1.972 down	2,34E-04	3.095 ± 0.234
FaPhytoSynthase (gene28765)	8.001 up	6,45E-04	8.655 ± 0.951	2.783 down	5,97E-06	5.162 ± 0.432
FaNSY (gene10665)	4.345 up	5,37E-04	19.26 ± 1.274	2.997 down	1,02E-05	3.184 ± 0.294

Gene ID	Auxins			Vegetative tissues		
	Microarray		qRT-PCR (relative expression values; up)	Microarray		qRT-PCR (relative expression values; up)
	fold	p-value		fold	p-value	
FaNCD1 (gene30616)	2.245 up	3,79E-04	3.75 ± 0.473	23.929 up	1,21E-11	8.823 ± 0.723
FaMYB10 (gene31413)	103.026 up	2,52E-03	109 ± 7.651	280.901 up	2,86E-12	234.987 ± 17.654
FaAAT2 (gene07931)	33.388 up	2,56E-03	142 ± 11.379	8709.803 up	5,73E-06	2441.011 ± 156.984
FaRGlyase (gene31030)	11.728 up	4,11E-03	20.9 ± 1.799	345.540 up	3,66E-09	1176.514 ± 103.214
FaNIP1;2 (gene23793)	10.113 up	3,17E-03	9.87 ± 1.256	11.909 up	3,56E-10	36.968 ± 4.168
FaEOBII (gene28435)	2.137 up	3,65E-03	7.5 ± 0.621	1.060 up	2,28E-04	1.327 ± 0.312
DOF (gene32526)	43.081 up	2,54E-03	9.32 ± 1.056	20.329 up	9,21E-12	34.968 ± 5.681
FaPL (gene17555)	9.339 up	3,32E-03	26.8 ± 2.184	40.984 up	4,11E-11	59.168 ± 7.166
FaPG1 (gene19241)	6.337 up	3,71E-03	28.37 ± 2.842	7.192 up	6,36E-09	28.354 ± 2.006
PME (gene17889)	11.211 up	2,90E-03	9.96 ± 0.741	20.571 up	1,14E-09	36.171 ± 2.998
FaQR (gene28406)	61.561 up	2,70E-03	8.58 ± 0.941	22.857 up	2,31E-08	88.165 ± 17.658
FaPRE1 (gene30478)	5.800 up	8,25E-03	5.4 ± 0.419	387.153 up	2,42E-07	221.387 ± 16.354
FaHMGCoA-Red (gene13004)	4.296 up	3,51E-03	4.841 ± 0.306	28.951 up	4,81E-11	41.387 ± 3.662
FaDXPs (gene20709)	9.231 up	2,79E-07	19.413 ± 1.887	3.045 up	3,00E-09	4.085 ± 0.296
FaPhytoSynthase (gene28765)	9.896 up	3,15E-03	27.684 ± 1.339	2.461 up	6,50E-10	4.007 ± 0.358
FaNSY (gene10665)	7.500 up	2,82E-03	25.601 ± 2.067	4.016 up	1,70E-10	11.025 ± 1.847

**Additional table 6.**

List of primer sequences used for qRT-PCR. Fw: forward; Rv: reverse.

Gene ID	Primer sequences	
Interspacer 26S-18S	5'-ACCGTTGATTTCGCACAATTGGTCATCG-3' 5'-TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG-3'	Fw Rv
FaNCED1 (gene30616)	5'-GAGCTTGAAGAGTGTGTTGTCCGAAA-3' 5'-CGGTCAGCAATGGCGAGATAAGCATA-3'	Fw Rv
FaMYB10 (gene31413)	5'-TGCCGGACGATTGCCAGGAAG-3' 5'-TGAAGGTCCGTGGTTCGA-3'	Fw Rv
FaAAT2 (gene07931)	5'-TGTGGAGGTGAGAGGACGACCCC-3' 5'-TGGCAAGCATACTGGCACCAAGATTTC-3'	Fw Rv
FaRGlyase (gene31030)	5'-TCCCTGATCGCTCAGCTGCCGA-3' 5'-TCGTGAGAGTTGGATCCTCGTGCCG-3'	Fw Rv
FaNIP1;2 (gene23793)	5'-GGGACTGACGGTGATGGTT-3' 5'-GGCGCGCTCATTGAGAGTTT-3'	Fw Rv
FaEOBII (gene28435)	5'-AGTGAGAAAAGGGCCGTGGACCA-3' 5'-ACCGGCAGATTTGGCAAGGGAG-3'	Fw Rv
DOF (gene32526)	5'-TTGGTTTGCAGGGTCTGTTAGACGA-3' 5'-TCGTTGTGGTGGTCGGTATCTTCAT-3'	Fw Rv
FaPL (gene17555)	5'-CAGATGCAAGTGACCATTGCCTAC-3' 5'-GTCTCCCTCTGATCTCCAGTTCCA-3'	Fw Rv
FaPG1 (gene19241)	5'-GTGAATTCTGGTGGCAACAGTTCC-3' 5'-CCTGACGGCTGATTCCGGTATTGAT-3'	Fw Rv
PME (gene17889)	5'-TCCTTGGTACCAGAACTACTC-3' 5'-CGATCGTAGCGCGGCCCATGTGC-3'	Fw Rv
FaQR (gene28406)	5'-TGAACCTTCTGCTGGTAAATCCG-3' 5'-TTTCTCTGGCAGTCTCTCGAAG-3'	Fw Rv
FaPRE1 (gene30478)	5'-ATAAGCTTTGGCAAACGCGAGGTT-3' 5'-GATACCTGATCGGAGCGCCTGT-3'	Fw Rv
FaHMGC <sub>o</sub> A-Red (gene13004)	5'-GCCTCCGACGCGCTGCCGTT-3' 5'-GCGGATCTTCTCGCGCCAACGGTG-3'	Fw Rv
FaDXPs (gene20709)	5'-AGATGGTCCCACCCACTGTGGAGCA-3' 5'-ACTGCTGCTGTGGCGACCATGTGCA-3'	Fw Rv
FaPhytoSynthase (gene28765)	5'-TCGTGCTGGACTCGCTGACCGAG-3' 5'-TTGCCATAACGGTTGGCATGCCCC-3'	Fw Rv
FaNSY (gene10665)	5'-TGGAAAACCAAATGGAGACGCGCCA-3' 5'-CGTGTGTGCTGGACCTTCCCGCA-3'	Fw Rv



### **Additional tables 7-14**

#### **GO annotation of differentially regulated genes in Clusters 1R-4G.**

This file is available only on CD rom version

### **Additional tables 15-24**

**Manual annotation of differentially regulated genes in functional groups sorted into the four R-up clusters.** Transcriptomic analyses of genes whose expression changes during fruit ripening, in fruits treated with NDGA, in de-achened fruits and specificity in receptacle. NDGA and minus achenes indicate the expression obtained for the genes studied in green–white fruits injected with NDGA 100 µm and green2 fruits whose achenes were removed, respectively. Intensity (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Chapter 2; Additional file 1.

This file is available only on CD rom version

### **Additional tables 25-28**

**Manual annotation of differentially regulated genes in the four R-down clusters sorted into functional groups.** Transcriptomic analyses of genes whose expression changes during fruit ripening, in fruits treated with NDGA, in de-achened fruits and specificity in receptacle. NDGA and minus achenes indicate the expression obtained for the genes studied in green–white fruits injected with NDGA 100 µm and green2 fruits whose achenes were removed, respectively. Intensity (a.u.i.) indicates the total signal intensity for each feature on the microarray platform. Gene ID as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature genetics **43**, 109-116). References are cited as supplemental references in Chapter 2; Additional file 1.

This file is available only on CD rom version

### **Additional file 1**

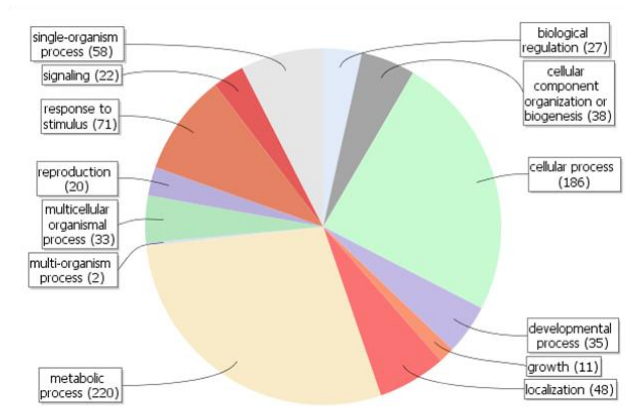
#### **Supplemental references cited in Tables 2-10 and Additional tables 15-28.**

This file is available only on CD rom version

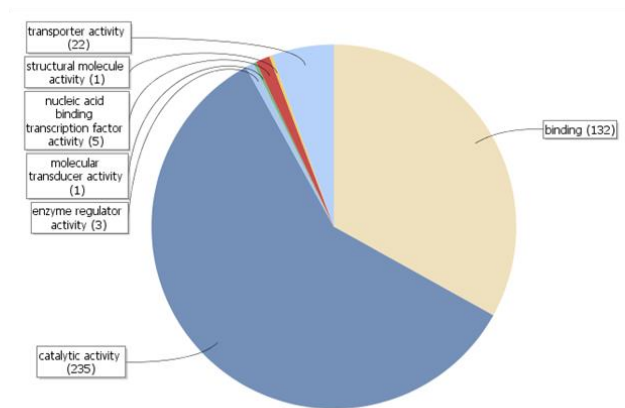
**Additional figure 1**

Distribution of differentially expressed genes in major functional terms (GO terms) for categories Biological Process, Molecular Function and Cellular Component.

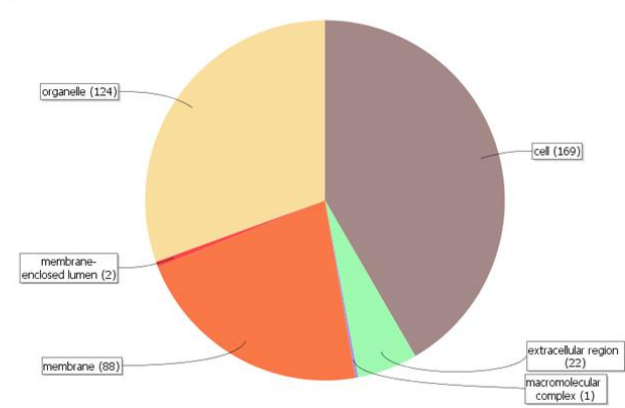
**R-up ABA-inducible AUX-repressed (Cluster 1R)**  
**Go Terms Biological Process (Level 2)**



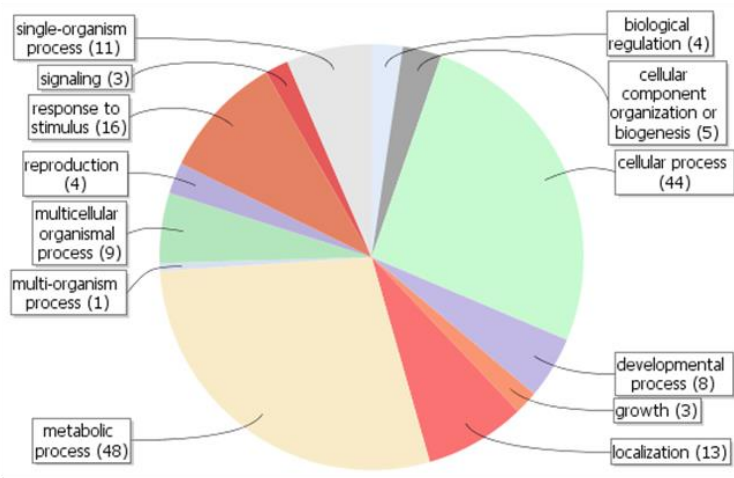
**Go Terms Molecular Functions (Level 2)**



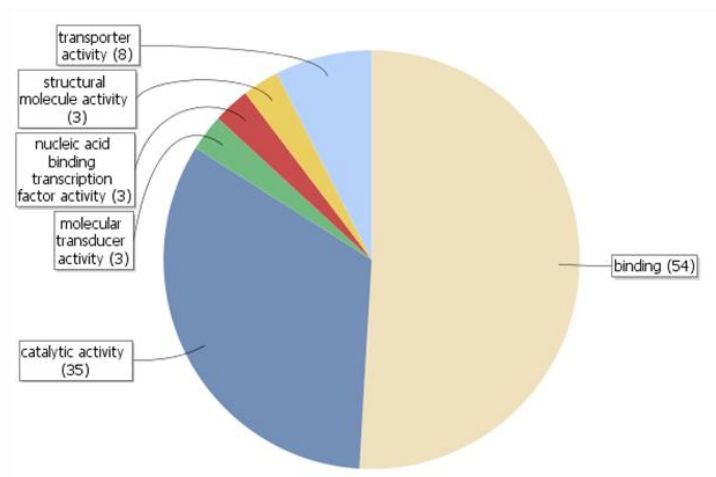
**Go Terms Cellular Components (Level 2)**



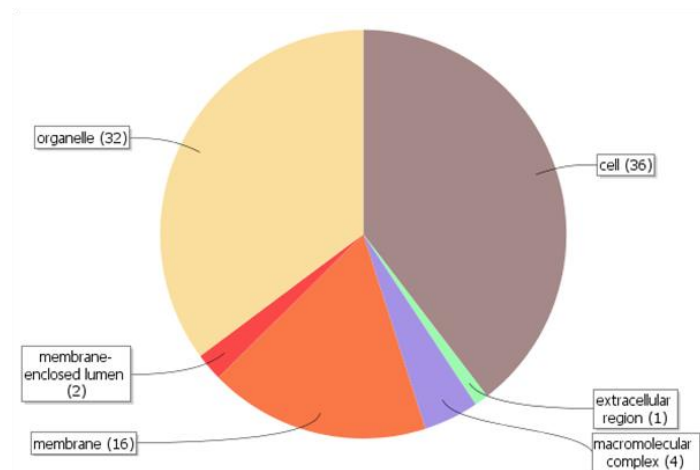
## R-up ABA-inducible AUX-no (Cluster 2R) Go Terms Biological Process (Level 2)



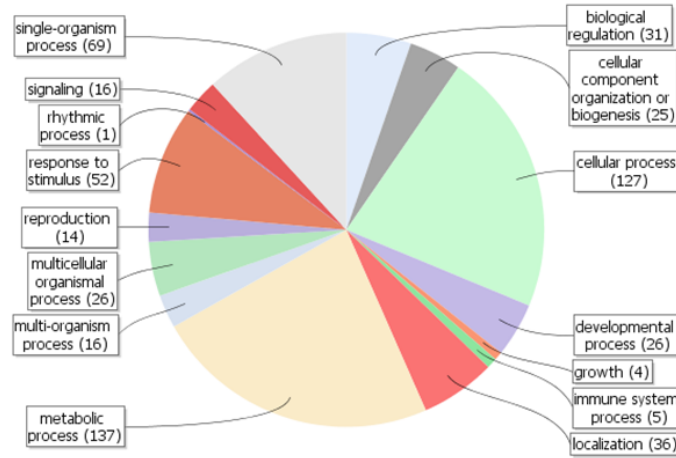
## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



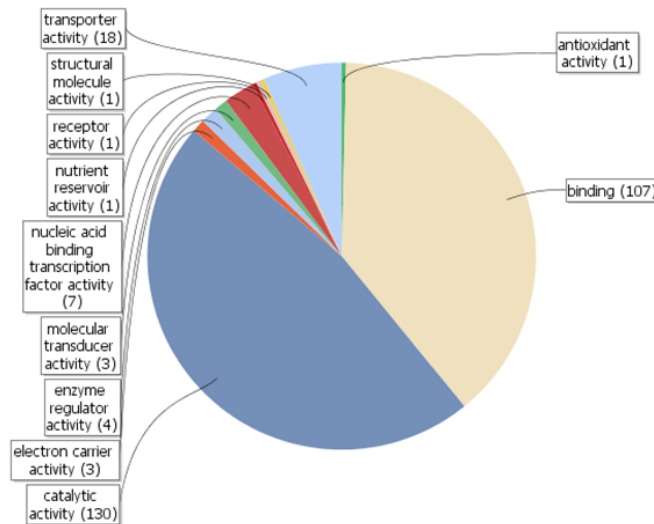
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



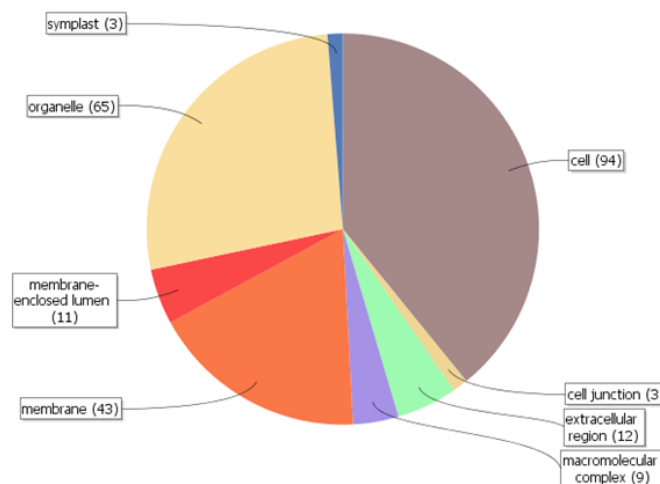
## R-up ABA-no AUX-repressed (Cluster 3R) Go Terms Biological Process (Level 2)



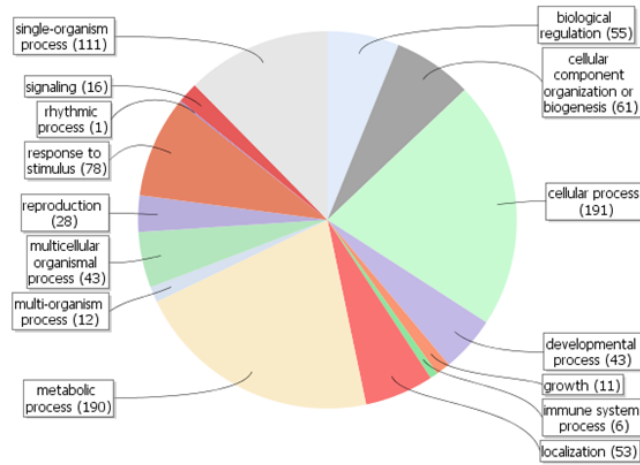
## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



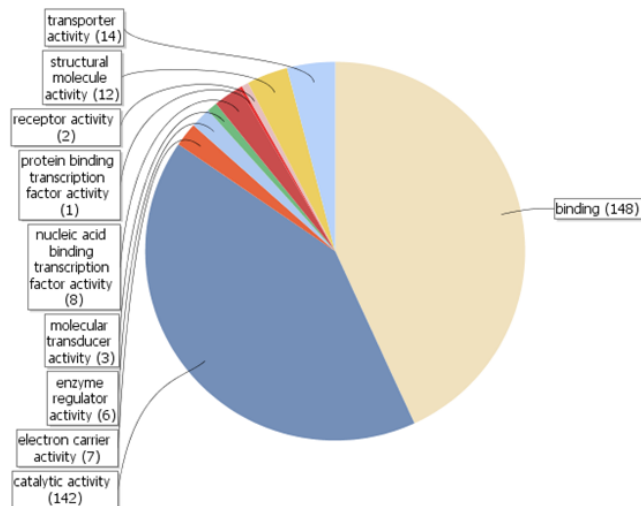
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



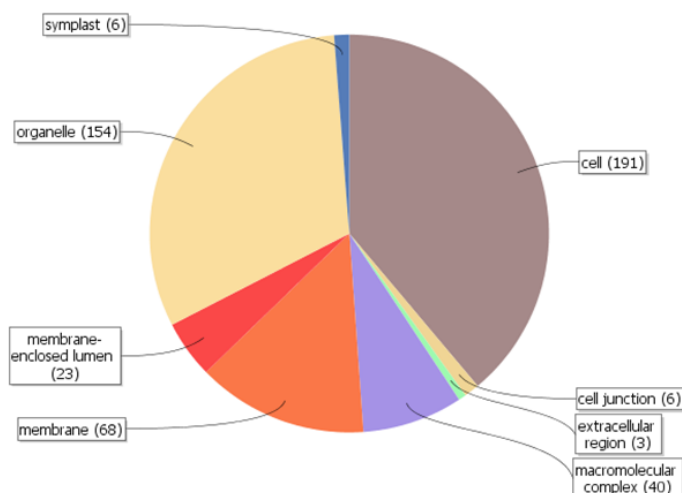
## R-up ABA-no AUX-no (Cluster 4R) Go Terms Biological Process (Level 2)



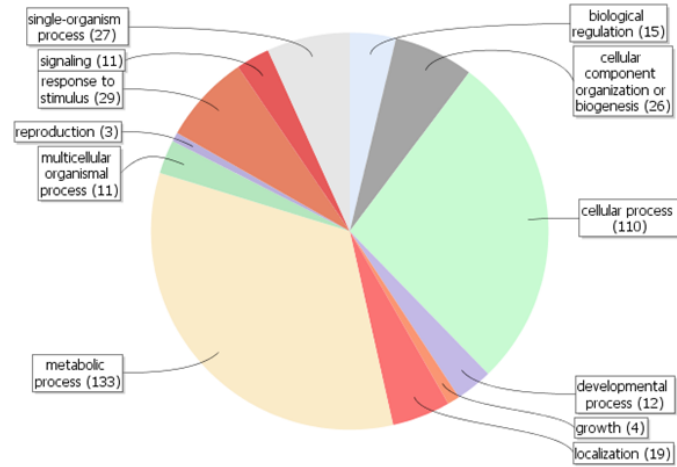
## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



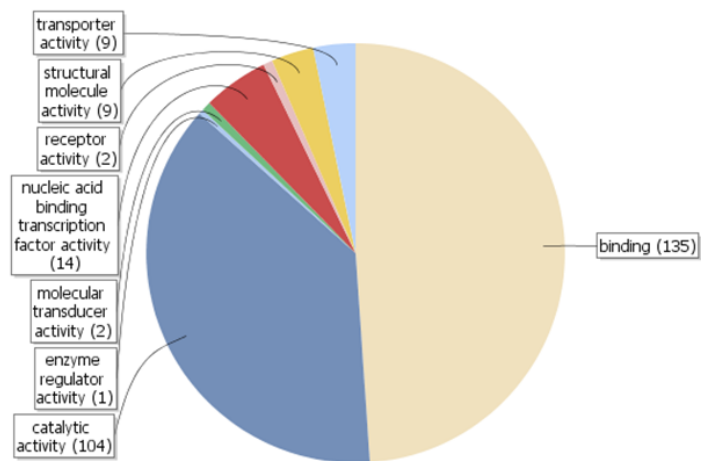
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



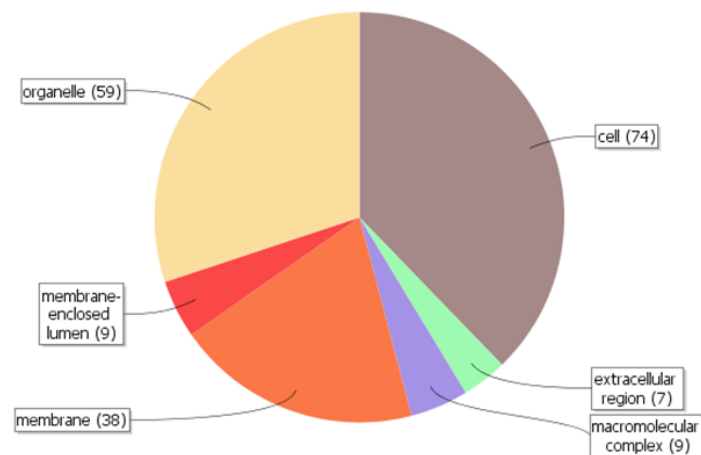
## R-down ABA-no AUX-inducible (Cluster 1G) Go Terms Biological Process (Level 2)



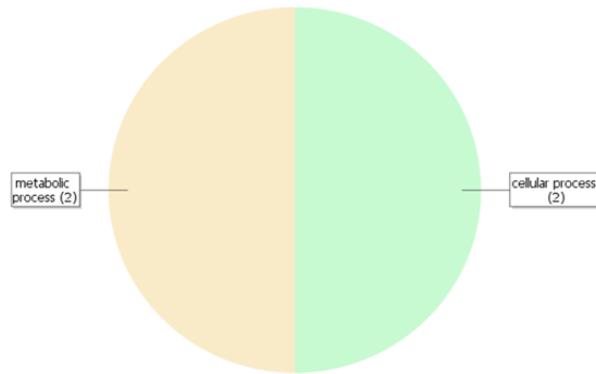
## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



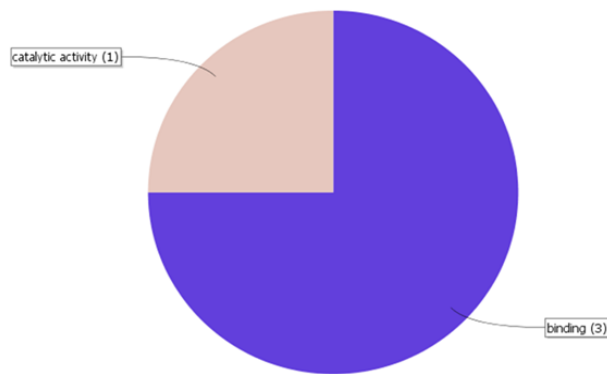
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



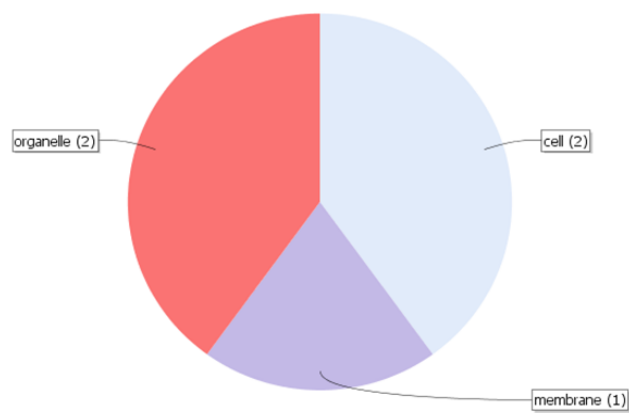
## R-down ABA-repressed AUX-inducible (Cluster 2G) Go Terms Biological Process (Level 2)



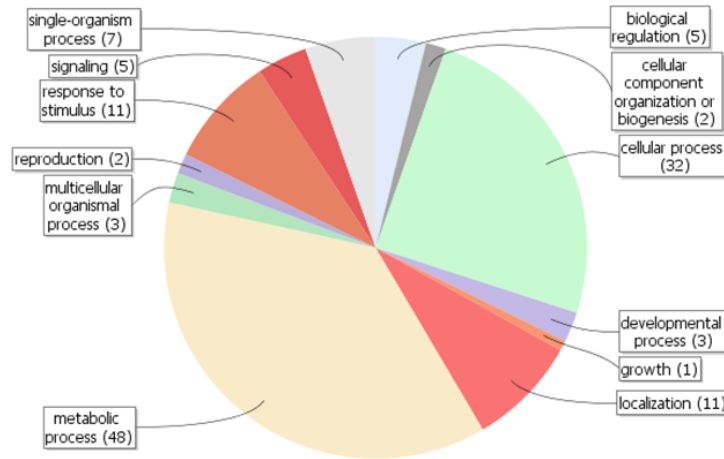
## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



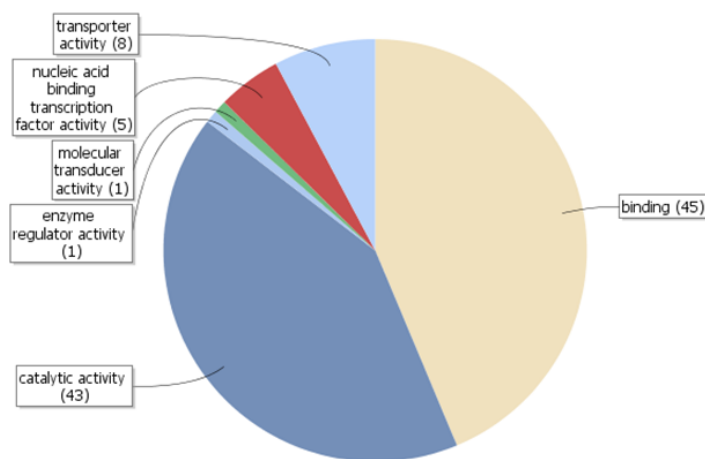
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



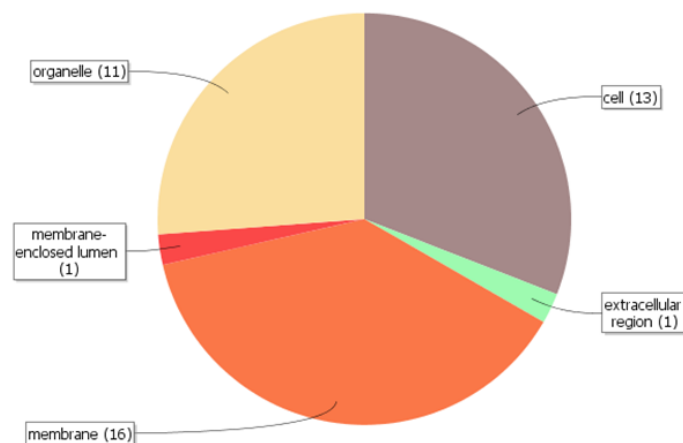
## R-down ABA-repressed AUX-no (Cluster 3G) Go Terms Biological Process (Level 2)



## Go Terms Molecular Functions (Level 2)



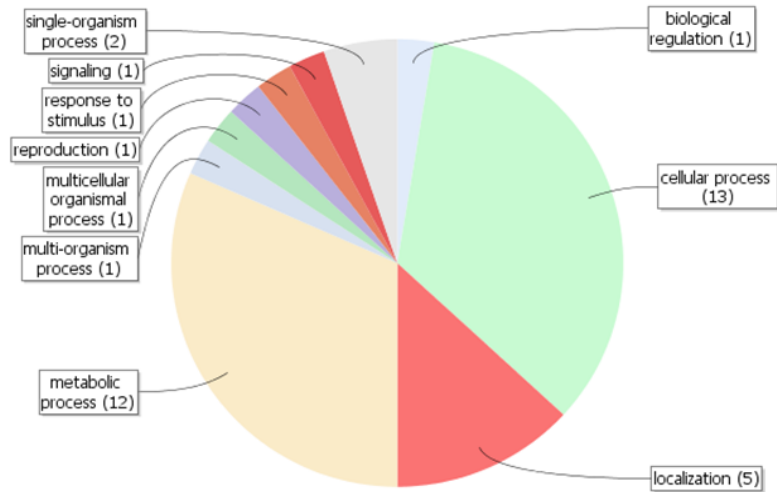
## Go Terms Cellular Components (Level 2)



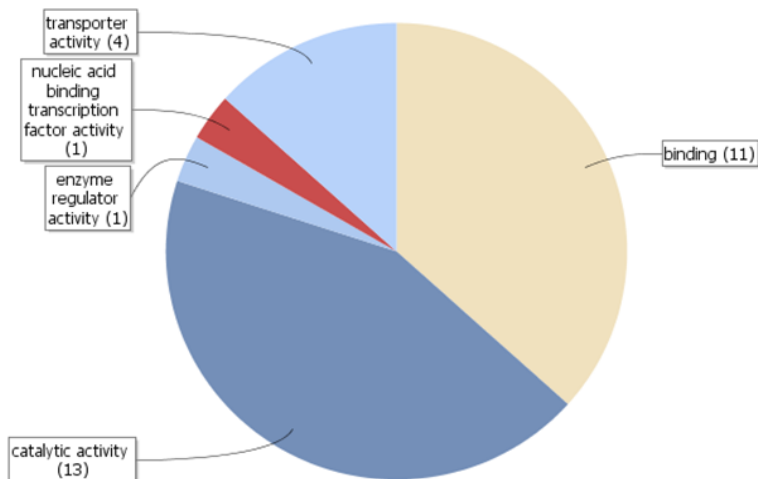


## R-down ABA-no AUX-no (Cluster 4G)

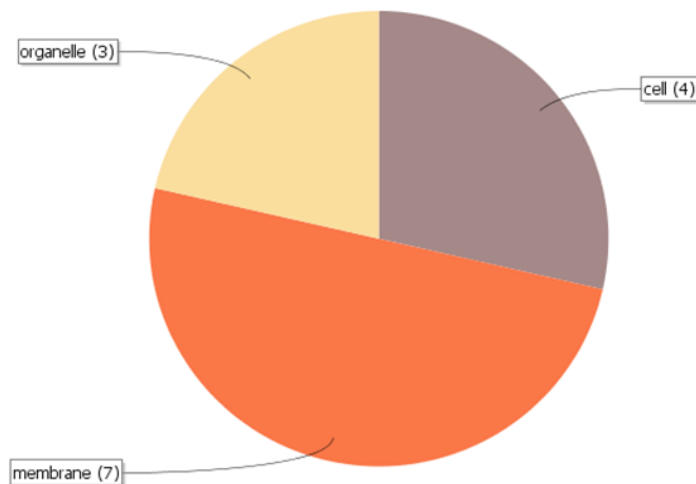
### Go Terms Biological Process (Level 2)



### Go Terms Molecular Functions (Level 2)



### Go Terms Cellular Components (Level 2)



## CHAPTER 3

### Additional table 1.

Subgroup classification of 61 plant MYB sequences examined in this study and additional information.

<i>Subgroup</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Species</i>	<i>Gene ID</i>
4	AtMYB3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_102111
4	AtMYB7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_127224
4	AtMYB4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_120023
5	AtTT2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_122946
6	AtMYB75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_104541
6	AtMYB90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105310
6	PhAN2	<i>Petunia x hybrida</i>	AAF66727
6	SIANT1	<i>Solanum lycopersicum</i>	AAQ55181
7	AtMYB12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_130314
7	AtMYB11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_116126
9	AtMYB106	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G01140
11	AtMYB102	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118264
12	AtMYB122	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106068
12	AtMYB34	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125482
12	AtMYB29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_120851
12	AtMYB28	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125535
12	AtMYB76	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_120852
15	AtGL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_113708
15	AtMYB23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123397
15	AtWER	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF126399
18	AtMYB33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_120692
18	AtMYB101	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_128805
18	AtMYB97	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118827
18	AtMYB120	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_124884
19	AtMYB57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_111019
19	AtMYB24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123399
19	AtMYB21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_113696
19	PsMYB26	<i>Pisum sativum</i>	Y11105
19	NlxNsMYB305	<i>Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae</i>	EU111679
19	PhEOBI	<i>Petunia x hybrida</i>	AGC00814
19	PhEOBII	<i>Petunia x hybrida</i>	EU360893
19	AmMYB305	<i>Antirrhinum majus</i>	P81391
19	AmMYB340	<i>Antirrhinum majus</i>	P81396
19	GmMYB181	<i>Glycine max</i>	NP001235850
19	GmMYB182	<i>Glycine max</i>	NP001235879
19	NaMYB305	<i>Nicotiana attenuata</i>	ADT82939

(Table continues on following page)

<i>Subgroup</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Species</i>	<i>Gene ID</i>
19	SIMYB305	<i>Solanum lycopersicum</i>	XP004233330
19	GhMYB24	<i>Gossypium hirsutum</i>	AFJ21697
19	GhMYB8	<i>Gerbera hybrid cultivar</i>	CAD87008
19	VvMYB24	<i>Vitis vinifera</i>	NP001268062
19	CaMYB305	<i>Cicer arietinum</i>	XP004489258
19	gene28435 (FvEOBII)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	XP004304632
19	FaEOBII	<i>Fragaria × ananassa</i>	KM099230
20	AtMYB78	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_124340
20	AtMYB108	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_111525
20	AtMYB112	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_103696
20	AtMYB2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_130287
20	AtMYB62	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105503
21	AtMYB69	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_119499
21	AtMYB52	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_101658
21	AtMYB54	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106001
24	AtMYB53	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125921
	AtMYB5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_112200
	AtMYB42	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G12350
	AtMYB85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118394
	AtMYB42	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT4G12350
	AtMYB85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118394
	AtMYB51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_101715
	AtMYB63	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106569
	AtMYB96	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125641
	AtMYB48	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_114482

## Additional table 2

## MYB Transcription Factors from strawberry

<i>ID</i>	<i>Gene name assigned</i>	<i>Description</i>	<i>Species</i>	<i>e-value</i>	<i>Access number</i>
<i>GENE18815</i>	<i>FaMYB2</i>	transcription factor DIVARICATA-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004302620
<i>GENE09510</i>	<i>FaMYB3</i>	transcription factor MYB1R1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	8,00E-173	XM_004299551
<i>GENE08868</i>	<i>FaMYB4</i>	transcription factor MYB1R1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	4,00E-152	XP_004299409
<i>GENE07984</i>	<i>FaMYB6</i>	transcription factor DIVARICATA-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004294220
<i>GENE23544</i>	<i>FaMYB7</i>	transcription factor DIVARICATA-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	4,00E-123	XM_004306964
<i>GENE26214</i>	<i>FaMYB8</i>	transcription factor DIVARICATA-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004299188
<i>GENE25733</i>	<i>FaMYB12</i>	MYB transcription factor-like (MYB2)	<i>Rosa rugosa</i>	0,00E+00	GU967441
<i>GENE00786</i>	<i>FaMYB13</i>	transcription factor DIVARICATA-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004297667
<i>GENE21159</i>	<i>FaMYB14</i>	transcription factor MYB1R1-like	<i>Vitis vinifera</i>	2,00E-68	XP_002278155
<i>GENE15401</i>	<i>FaMYB15</i>	transcription factor MYB1R1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	4,00E-19	XM_003545325
<i>GENE00185</i>	<i>FaMYB16</i>	transcription factor MYB44-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-165	XP_004291065
<i>GENE24027</i>	<i>FaMYB17</i>	transcription factor MYB44-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-176	XP_004287994
<i>GENE18756</i>	<i>FaMYB18</i>	putative MYB transcription factor	<i>Rosa hybrid</i>	6,00E-171	CCA29114
<i>GENE26289</i>	<i>FaMYB19</i>	transcription factor MYB44-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	9,00E-159	XP_004305954
<i>GENE21001</i>	<i>FaMYB20</i>	myb-related protein A-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	6,00E-128	XP_004308944
<i>GENE29254</i>	<i>FaMYB21</i>	transcription factor MYB44-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301570
<i>GENE18421</i>	<i>FaMYB22</i>	transcription factor MYB91	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	AAZ20441
<i>GENE08535</i>	<i>FaMYB23</i>	transcription factor MYB91	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	AAZ20441
<i>GENE19228</i>	<i>FaMYB24</i>	transcription factor ASG4(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004306691
<i>GENE13188</i>	<i>FaMYB25</i>	transcription factor ASG4(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004308001
<i>GENE18104</i>	<i>FaMYB26</i>	transcription factor ASG4(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004302789
<i>GENE24821</i>	<i>FaMYB27</i>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	8,00E-56	XP_004295005

(Table continues on following page)

<b>ID</b>	<b>Gene name assigned</b>	<b>Description</b>	<b>Species</b>	<b>e-value</b>	<b>Access number</b>
<b>GENE24820</b>	<b>FaMYB28</b>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,00E-61	XM_004294957
<b>GENE23202</b>	<b>FaMYB29</b>	SANT/myb family	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_190793
<b>GENE19867</b>	<b>FaMYB30</b>	MYB transcripion factor	<i>Ros hybrid</i>	0,00E+00	CCA29113
<b>GENE19866</b>	<b>FaMYB31</b>	Myb family transcription factor APL(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,00E-178	XP_004293427
<b>GENE16679</b>	<b>FaMYB32</b>	trancription factor PHR1-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004302055
<b>GENE08317</b>	<b>FaMYB33</b>	trancription factor PHR1-like(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004289934
<b>GENE27918</b>	<b>FaMYB34</b>	trancription factor PHR1-like(myb)	<i>Cucumis sativus</i>	1,00E-96	XP_004136602
<b>GENE09780</b>	<b>FaMYB35</b>	MYB transcription factor (myb6 gene)	<i>Rosa rugosa</i>	2,00E-162	FR828539
<b>GENE04733</b>	<b>FaMYB36</b>	Putative MYB transcripion factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004297247
<b>GENE19709</b>	<b>FaMYB37</b>	Myb family transcription factor APL(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004293768
<b>GENE21073</b>	<b>FaMYB38</b>	Myb family transcription factor MYR1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004288485
<b>GENE18340</b>	<b>FaMYB39</b>	MYB-like transcription factor	<i>Lotus japonicus</i>	5,00E-55	CCH22850
<b>GENE24269</b>	<b>FaMYB40</b>	Myb family transcription factor APL(myb)	<i>Cucumis sativus</i>	2,00E-28	XM_004139971
<b>GENE16677</b>	<b>FaMYB41</b>	trancription factor PHR1-like(myb)	<i>Cucumis sativus</i>	3,00E-31	XP_004151997
<b>GENE22961</b>	<b>FaMYB42</b>	transcription factor MYB29-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004302323
<b>GENE31836</b>	<b>FaMYB43</b>	transcription repressor MYB4-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300815
<b>GENE03817</b>	<b>FaMYB44</b>	myb-related protein 306-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004304297
<b>GENE26007</b>	<b>FaMYB45</b>	myb-related protein 306-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299363
<b>GENE10181</b>	<b>FaMYB46</b>	putative r2r3-myb transcription factor	<i>Ricinus communis</i>	7,00E-66	XP_002530950
<b>GENE07418</b>	<b>FaMYB47</b>	trichome differentiation protein GL1-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	8,00E-143	XP_004305745
<b>GENE32606</b>	<b>FaMYB48</b>	transcription factor WER-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,73E-142	XP_004289469
<b>GENE32611</b>	<b>FaMYB49</b>	transcription factor WER-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,25E-169	XP_004289469
<b>GENE28755</b>	<b>FaMYB50</b>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-96	XP_004305725
<b>GENE07484</b>	<b>FaMYB51</b>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	8,87E-54	XP_004305725
<b>GENE34508</b>	<b>FaMYB52</b>	transcription factor WER-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	4,06E-42	XP_004301772
<b>GENE12179</b>	<b>FaMYB53</b>	SNAT/myb-like family	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004299696

(Table continues on following page)

<b>ID</b>	<b>Gene name assigned</b>	<b>Description</b>	<b>Species</b>	<b>e-value</b>	<b>Access number</b>
<b>GENE13017</b>	<b>FaMYB54</b>	putative MYB DNA-binding domain superfamily protein	<i>Zea mays</i>	9,00E-08	AFW80249
<b>GENE02676</b>	<b>FaMYB55</b>	Putative MYB transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004292789
<b>GENE05018</b>	<b>FaMYB56</b>	Putative MYB transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004295042
<b>GENE25149</b>	<b>FaMYB57</b>	transcription factor TT2-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300516
<b>GENE05581</b>	<b>FaMYB58</b>	transcription factor RAX3-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004288285
<b>GENE28902</b>	<b>FaMYB59</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004293095
<b>GENE27379</b>	<b>FaMYB60</b>	transcription factor RAX3-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004296741
<b>GENE11462</b>	<b>FaMYB61</b>	transcription factor RAX3-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004296741
<b>GENE30736</b>	<b>FaMYB62</b>	myb-related protein Zm1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004293617
<b>GENE04057</b>	<b>FaMYB63</b>	transcription repressor MYB4-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	9,59E-171	XP_004297358
<b>GENE09406</b>	<b>FaMYB64</b>	myb-related protein 308-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	6,06E-110	XP_004299543
<b>GENE25982</b>	<b>FaMYB65</b>	transcription factor MYB12-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301157
<b>GENE15390</b>	<b>FaMYB66</b>	transcription factor TT2-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,42E-171	XP_004305612
<b>GENE15389</b>	<b>FaMYB67</b>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004305611
<b>GENE15386</b>	<b>FaMYB68</b>	transcription factor TT2-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	3,11E-147	XP_004303467
<b>GENE19065</b>	<b>FaMYB69</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004306804
<b>GENE30725</b>	<b>FaMYB70</b>	transcription factor MYB75-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004293589
<b>GENE01457</b>	<b>FaMYB71</b>	transcription factor MYB32-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004294888
<b>GENE26044</b>	<b>FaMYB72</b>	transcription factor MYB32-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301141
<b>GENE16287</b>	<b>FaMYB73</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004288189
<b>GENE01992</b>	<b>FaMYB74</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004293469
<b>GENE09546</b>	<b>FaMYB75</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301300
<b>GENE04710</b>	<b>FaMYB76</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004298414
<b>GENE00431</b>	<b>FaMYB77</b>	transcription factor GAMYB-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004306467
<b>GENE04800</b>	<b>FaMYB78</b>	transcription factor MYB28-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004308519

(Table continues on following page)

<b>ID</b>	<b>Gene name assigned</b>	<b>Description</b>	<b>Species</b>	<b>e-value</b>	<b>Access number</b>
<b>GENE03321</b>	<b>FaMYB79</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004295832
<b>GENE03323</b>	<b>FaMYB80</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	3,25E-114	XP_004295832
<b>GENE12261</b>	<b>FaMYB81</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004289595
<b>GENE03993</b>	<b>FaMYB82</b>	MYB transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004297276
<b>GENE00790</b>	<b>FaMYB83</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	6,13E-23	XP_004297324
<b>GENE09407</b>	<b>FaMYB1</b>	transcription factor MYB3-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,92E-116	XP_004299542
<b>GENE23113</b>	<b>FaMYB84</b>	trichome differentiation protein GL1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,82E-138	XP_004298561
<b>GENE24516</b>	<b>FaMYB85</b>	hypothetical protein PRUPE_ppa	<i>Prunus persica</i>	5,67E-45	EMJ22720
<b>GENE13743</b>	<b>FaMYB86</b>	MYB transcription factor MYB34	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-43	ABO32773
<b>GENE00600</b>	<b>FaMYB87</b>	MYBR domain class transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004297746
<b>GENE15767</b>	<b>FaMYB88</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004305446
<b>GENE27001</b>	<b>FaMYB89</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004308219
<b>GENE04232</b>	<b>FaMYB90</b>	transcription factor WER-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004306055
<b>GENE26045</b>	<b>FaMYB91</b>	transcription factor MYB32-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301140
<b>GENE28293</b>	<b>FaMYB92</b>	myb-related protein 305-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	3,17E-174	XP_004296547
<b>GENE18416</b>	<b>FaMYB93</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004305203
<b>GENE19115</b>	<b>FaMYB94</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004308398
<b>GENE13016</b>	<b>FaMYB95</b>	transcription factor DIVARICATA (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	8,00E-41	XM_002310657
<b>GENE26513</b>	<b>FaMYB96</b>	transcription factor MYB113-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	3,97E-48	XP_004288854
<b>GENE31407</b>	<b>FaMYB97</b>	transcription factor MYB113-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,10E-44	XP_004304847
<b>GENE32198</b>	<b>FaMYB98</b>	transcription factor MYB98-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300902
<b>GENE31098</b>	<b>FaMYB99</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004288785
<b>GENE16736</b>	<b>FaMYB100</b>	transcription factor MYB113-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	3,11E-114	XP_004302122
<b>GENE15383</b>	<b>FaMYB101</b>	transcription factor MYB23-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	5,57E-157	XP_004303466
<b>GENE25685</b>	<b>FaMYB102</b>	transcription factor MYB3-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299892
<b>GENE21456</b>	<b>FaMYB103</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004291570

(Table continues on following page)

<i>ID</i>	<i>Gene name assigned</i>	<i>Description</i>	<i>Species</i>	<i>e-value</i>	<i>Access number</i>
<i>GENE09683</i>	<i>FaMYB104</i>	transcription factor MYB48-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,04E-142	XP_004306261
<i>GENE09663</i>	<i>FaMYB105</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004304464
<i>GENE11356</i>	<i>FaMYB106</i>	transcription factor RAX1-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	9,50E-164	XP_004309212
<i>GENE13281</i>	<i>FaMYB107</i>	transcription factor LAF1-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004309212
<i>GENE29961</i>	<i>FaMYB108</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004294062
<i>GENE28021</i>	<i>FaMYB109</i>	myb-related protein 315-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	5,15E-172	XP_004306403
<i>GENE31413</i>	<i>FaMYB10</i>	<b>R2R3 MYB transcription factor (<i>FaMYB10</i>)</b>	<i>Fragaria × ananassa</i>	2,00E-134	EU155162
<i>GENE19715</i>	<i>FaMYB110</i>	R2R3-myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	4,00E-160	XM_004293805
<i>GENE28435</i>	<i>FaEOBII</i>	<b>R2R3-myb transcription factor (<i>FaEOBII</i>)</b>	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-121	XM_004304584
<i>GENE25060</i>	<i>FaMYB111</i>	R2R3-myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-111	XM_004294504
<i>GENE02643</i>	<i>FaMYB112</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004292782
<i>GENE03712</i>	<i>FaMYB113</i>	transcription factor WER-like (myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299054
<i>GENE13970</i>	<i>FaMYB114</i>	transcription factor MYB59-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	5,28E-128	XP_004295946
<i>GENE06920</i>	<i>FaMYB115</i>	transcription factor MYB21-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004305719
<i>GENE20888</i>	<i>FaMYB116</i>	myb protein-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004307600
<i>GENE01013</i>	<i>FaMYB117</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004292552
<i>GENE09412</i>	<i>FaMYB118</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301260
<i>GENE22647</i>	<i>FaMYB119</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004304375
<i>GENE32418</i>	<i>FaMYB120</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300765
<i>GENE02324</i>	<i>FaMYB121</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301809
<i>GENE30024</i>	<i>FaMYB122</i>	transcription factor MYB39-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300644
<i>GENE01998</i>	<i>FaMYB123</i>	transcription factor MYB28-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004293474
<i>GENE18691</i>	<i>FaMYB5</i>	transcription factor MYB12-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004306648
<i>GENE15391</i>	<i>FaMYB124</i>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004305613
<i>GENE09039</i>	<i>FaMYB125</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	2,00E-139	XP_004291141
<i>GENE31835</i>	<i>FaMYB126</i>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004300814

(Table continues on following page)



<b>ID</b>	<b>Gene name assigned</b>	<b>Description</b>	<b>Species</b>	<b>e-value</b>	<b>Access number</b>
<b>GENE08793</b>	<b>FaMYB127</b>	myb-related protein 3R-1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004291202
<b>GENE15392</b>	<b>FaMYB9</b>	transcription factor TT2-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004303468
<b>GENE02652</b>	<b>FaMYB128</b>	putative MYB transcription factor	<i>Rosa rugosa</i>	2,04E-126	CCA29098
<b>GENE14666</b>	<b>FaMYB129</b>	myb-related protein Hv33-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004291790
<b>GENE25098</b>	<b>FaMYB130</b>	transcription repressor MYB5-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	1,47E-159	XP_004301814
<b>GENE01997</b>	<b>FaMYB131</b>	myb-related protein Hv1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	7,96E-175	XP_004295360
<b>GENE07416</b>	<b>FaMYB11</b>	transcription factor TT2-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004303684
<b>GENE08084</b>	<b>FaMYB132</b>	myb-related protein Myb4-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004289939
<b>GENE09311</b>	<b>FaMYB133</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299490
<b>GENE04728</b>	<b>FaMYB134</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299490
<b>GENE05518</b>	<b>FaMYB135</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004303787
<b>GENE28443</b>	<b>FaMYB136</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004306352
<b>GENE05167</b>	<b>FaMYB137</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004295109
<b>GENE02214</b>	<b>FaMYB138</b>	transcription factor MYB39-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004301783
<b>GENE13545</b>	<b>FaMYB139</b>	Myb family transcription factor APL(myb)	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XM_004301592
<b>GENE00738</b>	<b>FaMYB140</b>	transcription factor MYB1R1-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004297686
<b>GENE08006</b>	<b>FaMYB141</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004295744
<b>GENE09845</b>	<b>FaMYB142</b>	Putative Myb transcription factor	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004299133
<b>GENE07646</b>	<b>FaMYB143</b>	myb-related protein 308-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	5,00E-169	XP_004289866
<b>GENE04423</b>	<b>FaMYB144</b>	transcription factor MYB39-like	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004304285
<b>GENE23946</b>	<b>FaMYB145</b>	uncharacterized protein LOC101300860	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	0,00E+00	XP_004289172

**Additional table 3.**

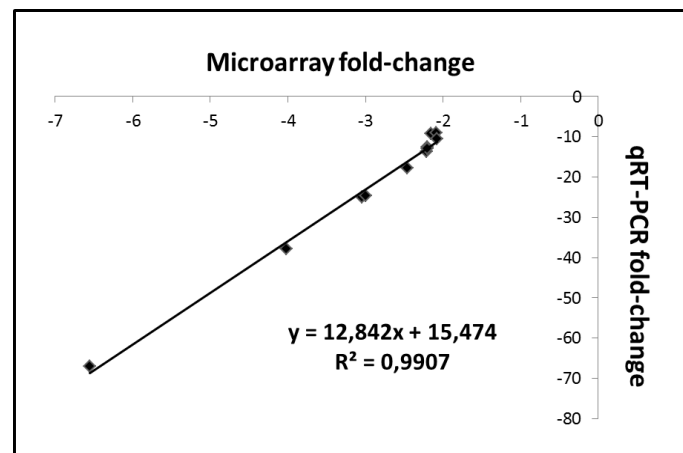
**Total Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Transiently-Silenced *FaEOBII* Fruits and Control Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

**Additional table 4.**

**Microarray and qRT-PCR results of the 11 genes differentially regulated in the transgenic transiently-silenced *FaEOBII* fruits versus control fruits.**

	<i>Microarray</i>	<i>qRT-PCR</i>
<i>gene ID</i>	<i>fold-change</i>	<i>fold-change</i>
gene28435	6.549 down	67.065 down
gene25260	4.019 down	37.937 down
gene20700	3.047 down	25.071 down
gene20643	2.991 down	24.693 down
gene32526	2.465 down	17.825 down
gene25718	2.208 down	13.754 down
gene21312	2.207 down	12.491 down
gene12176	2.202 down	12.954 down
gene18910	2.150 down	9.321 down
gene06729	2.083 down	8.984 down
gene30534	2.076 down	10.586 down



**Additional table 5.**

**Primer sequences used for qRT-PCR.** Fw: forward; Rv: reverse. Up: upper; Low: lower

<i>Gene</i>		<i>Primer sequences</i>
<b>gene33863 (Interspacer 26S-18S)</b>	<i>413-A</i>	5' - ACC GTT GAT TCG CAC AAT TGG TCA TCG - 3'
	<i>413-B</i>	5' - TAC TGC GGG TCG GCA ATC GGA CG - 3'
<b>gene31413 (FaMYB10)</b>	<i>Famyb10 up</i>	5' - TGC CGG ACG ATT GCC AGG AAG - 3'
	<i>Famyb10 low</i>	5' - TGA AGG TCC GTG GTC GA - 3'
<b>gene09753 (PAL)</b>	<i>FaPAL fw</i>	5' - GAT GCA AAG GCT AAG GCA AG - 3'
	<i>FaPAL rv</i>	5' - AGC CCT AAC GCT CTC AAC CT - 3'
<b>gene28093 (C4H)</b>	<i>FaC4H fw</i>	5' - TGC CCT TGG CTT CAT GAC T - 3'
	<i>FaC4H rv</i>	5' - GCT TGA CAC TAC GGA GAA AGG - 5'
<b>gene09603 (4CL)</b>	<i>4CL-2</i>	5' - GAT GAC GGA GGC GAC CCA TTT GAT G - 3'
	<i>4CL-3</i>	5' - GGC ACG ATT TGA TCA CCT CCA CGG - 3'
<b>gene21346 (CHI)</b>	<i>FaCHI fw</i>	5' - GTC AAT GTA CCCT ATA TCA CC - 3'
	<i>FaCHI rv</i>	5' - GCT CAG TTT CAT GCC TTG AC - 3'
<b>gene26826 (CHS)</b>	<i>FaCHS fw</i>	5' - GCC TTT GTT TGA GCT GGT CT - 3'
	<i>FaCHS rv</i>	5' - CCC AGG AAC ATC TTT GAG GA - 3'
<b>gene30616 (FaNCED1)</b>	<i>NCED1 up</i>	5' - GAG CTT GAA GAG TGT GTT GTC CGA AA - 3'
	<i>NCED1 low</i>	5' - CGG TTC AGC AAT GGC GAG ATA AGC ATA - 3'
<b>gene28435 (FaEOBII)</b>	<i>EOBII up</i>	5' - AGT GAG AAA AGG GCC GTG GAC CA - 3'
	<i>EOBII low</i>	5' - ACC GGC AGA TTT GGC AAG GGA G - 3'
<b>gene20700 (FaCAD1)</b>	<i>FaCAD1 up</i>	5' - CGA CTT GAT CTT CCG CAG TT - 3'
	<i>FaCAD1 low</i>	5' - TGG AGT TGA TGA CCA CAA TGT T - 3'
<b>gene25260 (FaEGS2)</b>	<i>FaEGS2 up</i>	5' - ATG CTG TTG AGC CCG CGA AGA CGA C - 3'
	<i>FaEGS2 low</i>	5' - TCC CTA GGA GGG GCA GTG GCT CCG - 3'
<b>gene29483 (CCR)</b>	<i>FaCCR up</i>	5' - GTG CTG GAA AGG CAC TGG - 3'
	<i>FaCCR low</i>	5' - TTG GCA ACA ACA ACT CTT GC - 3'
<b>gene32268 (FaODO1)</b>	<i>FaODO1 fw</i>	5' - TTG GAA ATA GGT GGT CCA AGA - 3'
	<i>FaODO1 rv</i>	5' - TGT TCC AGT GAT TCT TGA TTT CAT - 3'
<b>gene15165 (FaEGS1)</b>	<i>FaEGS1 fw</i>	5' - CTT ACT CCT TTA ATG AAC TCG TTG C - 3'
	<i>FaEGS1 rv</i>	5' - AGA CCT TCG TAA GAA CTT TTC CAA - 3'
<b>gene20643</b>	<i>gene20643 fw</i>	5' - CCA GTA TGA AGG TGC TGC AA - 3'
	<i>gene20643 rv</i>	5' - TTG TGG GTG AAA GTA TCC CAT A - 3'
<b>gene25718</b>	<i>gene25718 fw</i>	5' - TAC CT CTC ATT CCC TGT TGG - 3'
	<i>gene25718 rv</i>	5' - GCC TTG TTT TTC AAT GGC TTT - 3'
<b>gene21312</b>	<i>gene21312 fw</i>	5' - CGT CTT GCA GAG TCT ACT ACG G - 3'
	<i>gene21312 rv</i>	5' - CTG CGA CTC CCA CAT GAA C - 3'
<b>gene12176</b>	<i>gene12176 fw</i>	5' - GAA ATT GCC AAA TGG TCA GAA - 3'
	<i>gene12176 rv</i>	5' - CAA CAA GTT CCT TAC GGC TAA AG - 3'
<b>gene18910</b>	<i>gene18910 fw</i>	5' - TGG TAT TTA CTT AGC TTC CAG ATT CC - 3'
	<i>gene18910 rv</i>	5' - CAT AGC TGT CTC TGG CAT ACA AA - 3'
<b>gene06729</b>	<i>gene06729 fw</i>	5' - CCT TTC TCG GCT TCT CGA AT - 3'
	<i>gene06729 rv</i>	5' - AAA AGC AAG AGC GAA ACA GAA - 3'
<b>gene30534</b>	<i>gene30534 fw</i>	5' - GAT CCA ATC CAG TAC GGT TCA - 3'
	<i>gene30534 rv</i>	5' - CAC AGA GGC ATG GAA CCT G - 3'

## CHAPTER 4

## Additional table 1.

Subfamily classification of 182 plant bHLH sequences examined in this study and additional information.

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	At001GL3	At5g41315	GL3	17885086	637	G binder
	5	At002EGL1	At1g63650	MYC2, EGL1, EGL3	11063707	596	G box
	2	At003	At4g16430			467	G box
	2	At004MYC4	At4g17880	MYC4	12509522	589	G box
	2	At005MYC3	At5g46760	ATR2, MYC3	12136026	592	G box
	2	At006MYC2	At1g32640	MYC2, ZBF1, JAI1	12509522	623	G box
	26	At007	At1g03040			302	G binder
	24	At008PIF3	At1g09530	PIF3, POC1	9845368	524	G binder
	24	At009PIF4	At2g43010	PIF4	12006496	430	G binder
	9	At010	At2g31220			458	E non G
	4	At011	At4g36060			286	G binder
	5	At012MYC1	At4g00480	MYC1	8980509	526	non DNA-binder
	2	At014	At4g00870			423	G box
	24	At015PIL5	At2g20180	PIL5	15486102	407	G binder
	24	At016UN10	At4g00050	UNE10	15634699	399	G binder
	2	At017AIB	At2g46510	AIB	17828375	566	G box
	3	At018	At2g22750			304	G binder
	3	At019	At2g22760			295	G binder
	3	At020NAI1	At2g22770	NAI1	18780803	320	G binder

*(Table continues on following page)*

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	At021AMS	At2g16910	AMS	12535353	571	E non G
	1	At022DYT1	At4g21330	DYT1	16831835	207	E non G
	24	At023	At4g28790			413	G binder
	24	At024SPT	At4g36930	SPT	11245574	373	G binder
	3	At025	At4g37850			328	G binder
	24	At026HFR1	At1g02340	HFR1	10995393	292	non E-binder
	1	At027	At4g29930			254	E box
	2	At028	At5g46830			511	G binder
	1	At029FRU	At2g28160	FRU	15556641	318	E non G
	13	At030	At1g68810			368	G binder
	25	At031ZCW	At1g59640	BPE, ZCW32	16902407	264	G binder
	13	At032	At3g25710			344	G binder
	1	At033SCRM	At1g12860	SCRM2	18641265	828	E non G
	4	At034	At3g23210			320	G binder
	1	At035	At5g57150			247	E box
	12	At036	At5g51780			174	G binder
	31	At037HEC2	At3g50330	HEC2	17855426	231	non E-binder
	12	At038ORG2	At3g56970	ORG2	12887587	253	G binder
	12	At039ORG3	At3g56980	ORG3	12887587	258	G binder
	31	At040IND	At4g00120	IND, EDA33	15035986	198	non E-binder
	7	At041	At5g56960		12509522	466	G box
	5	At042TT8	At4g09820	TT8	11041882	518	G binder
	31	At043HEC3	At5g09750	HEC3	17855426	224	non DNA-binder
	25	At044BEE1	At1g18400	BEE1	12454087	260	G binder
	10	At045MUTE	At3g06120	MUTE	17183267	202	G box

(Table continues on followin page

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	14	At046BIM1	At5g08130	BIM1	15680330	409	G binder
	4	At047	At3g47640			240	non E-binder
	25	At048	At2g42300			327	G binder
	25	At049	At1g68920			486	G binder
	25	At050BEE3	At1g73830	BEE3	12454087	261	G binder
	13	At051	At2g40200			254	G binder
	30	At052	At1g30670			264	non E-binder
	30	At053	At2g34820			291	non E-binder
	28	At054	At1g27740			258	non E-binder
	12	At055	At1g12540			198	G binder
	24	At056	At4g28800			441	G binder
	10	At057	At4g01460			315	G binder
	25	At058BEE2	At4g36540	BEE2	12454087	304	G binder
	26	At059UN12	At4g02590	UNE12	15634699	310	G binder
	25	At060	At3g57800			426	G binder
	1	At061	At5g10570			315	E non G
	25	At062	At3g07340			456	G binder
	25	At063CIB1	At4g34530	CIB1	18988809	335	G binder
	25	At064	At2g18300			335	G binder
	24	At065PIL6	At3g59060	PIF5, PIL6	12826627	442	G binder
	26	At066	At2g24260			350	G binder
	10	At067	At3g61950			358	G binder
	15	At068	At4g29100			407	non DNA-binder
	26	At069	At4g30980			310	G binder
	10	At070	At2g46810			371	G binder

*(Table continues on following page)*

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	At071	At5g46690			327	G binder
	24	At072PIF7	At5g61270	PIF7	18252845	366	G binder
	24	At073ALC	At5g67110	ALC	11747817	210	G binder
	25	At074	At1g10120			366	G binder
	25	At075	At1g25330			223	G binder
	25	At076	At1g26260			390	G binder
	25	At077	At3g23690			371	G binder
	25	At078	At5g48560			498	G binder
	25	At079	At5g62610			281	G binder
	27	At080	At1g35460			259	E non G
	27	At081	At4g09180			262	E non G
	26	At082	At5g58010			297	G binder
	28	At083RHD6	At1g66470	RHD6	17556585	298	non DNA-binder
	28	At084	At2g14760			328	non E-binder
	28	At085	At4g33880			352	non E-binder
	28	At086RSL1	At5g37800	RSL1	17556585	307	non DNA-binder
	31	At087	At3g21330			373	non DNA-binder
	31	At088HEC1	At5g67060	HEC1	17855426	241	non E-binder
	9	At089	At1g06170			420	E non G
	1	At090	At1g10610			441	E non G
	9	At091	At2g31210			428	E non G
	7	At092	At5g43650			247	G binder
	1	At093	At5g65640			351	E non G
	10	At094	At1g22490			304	G binder

*(Table continues on following page)*

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	11	At095ZOU	At1g49770	ZOU	18849529	308	G box
	10	At096	At1g72210			320	G binder
	10	At097FMA	At3g24140	FMA	17088607	414	G binder
	10	At098SPCH	At5g53210	SPCH	17183265	364	G binder
	10	At099	At5g65320			296	G binder
	12	At100	At2g41240			242	G binder
	12	At101	At5g04150			240	G binder
	14	At102BIM2	At1g69010	BIM2	15680330	311	G binder
	15	At103	At4g21340			301	non E-binder
	4	At104	At4g14410			283	G binder
	4	At105ILR3	At5g54680	ILR3	17028341	234	G binder
	13	At106	At2g41130			253	G binder
	13	At107	At3g56770			230	G binder
	orphan	At108MEE8	At1g25310	MEE8	15634699	145	non E-binder
	24	At109	At1g68240			185	E non G
	15	At110	At1g27660			453	non E-binder
	15	At112	At1g61660			393	non E-binder
	15	At113	At3g19500			270	non E-binder
	15	At114	At4g05170			238	non E-binder
	4	At115	At1g51070			226	G binder
1	At116ICE1	At3g26744	ICE1	12672693	494	E non G	
30	At117	At3g22100			252	non DNA-binder	
12	At118	At4g25400			163	G binder	
24	At119	At4g28811			544	G binder	
12	At120	At5g51790			209	G binder	

*(Table continues on following page)*



<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	At121	At3g19860			284	G binder
	27	At122	At1g51140			379	E non G
	15	At123	At3g20640			454	non E-binder
	24	At124PIL1	At2g46970	PIL1	11828023	416	G binder
	12	At125	At1g62975			259	G binder
	12	At126	At4g25410			221	G binder
	24	At127	At4g28815			307	G binder
	27	At128	At1g05805			362	E non G
	27	At129	At2g43140			297	E non G
	27	At130	At2g42280			359	E non G
	13	At131	At4g38070			1513	G binder
	24	At132PIL2	At3g62090	PIL2		346	non E-binder
	16	At134PRE2	<i>At5g15160</i>	PRE2	16527868	94	non DNA-binder
	16	At135PRE3	At1g74500	PRE3	16527868	93	non E-binder
	16	At136PRE1	At5g39860	PRE1	16527868	92	non DNA-binder
	25	At137	At5g50915		17933900	286	G binder
	9	At138	At2g31215			129	E non G
	28	At139	At5g43175			223	non E-binder
	2	At13MYC7E	At1g01260	MYC7E		590	G box
	31	At140	At5g01310			912	non DNA-binder
	14	At141BIM3	At5g38860	BIM3	15680330	298	G binder
	17	At142SAC5	At5g64340	SAC51	18694459	348	non DNA-binder
	17	At143	At5g09460			326	E box
	17	At144	At1g29950			251	non DNA-binder
	17	At145	At5g50010			311	non E-binder

*(Table continues on following page)*

<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	21	At146	At4g30180			158	non DNA-binder
	19	At147	At3g17100			230	non E-binder
	19	At148	At3g06590			221	non E-binder
	19	At149	At1g09250			207	non E-binder
	19	At150	At3g05800			211	non E-binder
	orphan	At151	At2g47270			102	non E-binder
	15	At153	At1g05710			149	non E-binder
	15	At154ERP	At2g31730	ERP	17933900	153	non E-binder
	23	At155CPu	At2g31280	CPU	17663791	720	non E-binder
	23	At156LHW	At2g27230	LHW	17626058	650	non E-binder
	23	At157	At1g64625			527	non E-binder
	18	At158	At2g43060			156	non E-binder
	20	At159P1r2	At4g30410	P1R2	17948056	180	non E-binder
	orphan	At160	At1g71200			255	G binder
	16	At161PRE4	At3g47710	PRE4	16527868	92	non DNA-binder
	12	At162	At4g20970			190	E non G
	16	At163KDR	At1g26945	KDR, PRE6	16786307	94	non DNA-binder
	16	At164PRE5	At3g28857	PRE5	16527868	92	non DNA-binder
	21	At165PAR1	At2g42870	PAR1	17948056	118	non DNA-binder
	21	At166PAR2	At3g58850	PAR2	17948056	118	non DNA-binder
	20	At167P1r1	At5g57780	P1R1	17948056	167	non E-binder
	22	At168P1r3	At3g29370	P1R3	17948056	101	non DNA-binder
	22	At169	At5g39240			106	non E-binder
21	At170	At2g18969			175	non DNA-binder	
<i>Fragaria × ananassa</i>	16	FaPRE1			KM655802	93	

(Table continues on following page)

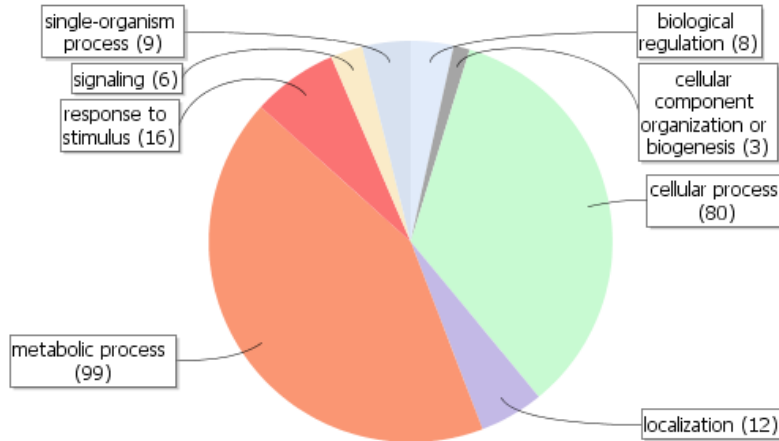
<i>Species</i>	<i>Subfamily</i>	<i>Sequence Name</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Alternative Names</i>	<i>PUBMED ID</i>	<i>Protein length</i>	<i>DNA-binding motif</i>
<i>Fragaria × ananassa</i>	24	FaSPT			AY679615	298	
	5	FabHLH3			JQ989284	697	
	5	FabHLH33			JQ989286	260	
	5	FaMYC1			JQ989283	368	
<i>Cicer arietinum</i>	16	CabHLH135			XP004491783	93	
<i>Glycine max</i>	16	GmbHLH135			XP003534454	92	
<i>Medicago truncatula</i>	16	Mtstyle2.1			XP003621179	93	
<i>Oryza sativa</i>	16	OsbHLH			NP001049112	92	
<i>Ricinus communis</i>	16	Rc T.R.			XP002517494	90	
<i>Setaria italica</i>	16	SibHLH135			XP004985540	92	
<i>Solanum lycopersicum</i>	16	SlbHLH135			XP004233358	94	
<i>Theobroma cacao</i>	16	TcbHLH			EOY03421	91	
<i>Theobroma cacao</i>	16	TcBSU1			EOY21783	91	
<i>Vitis vinifera</i>	16	VvbHLH135			XP002283094	90	

**Additional figure 1.**

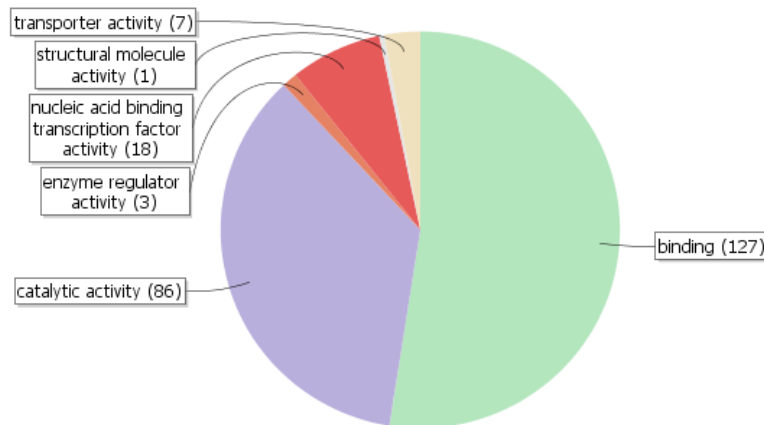
Distribution of differentially expressed genes in major functional terms (GO terms) for categories Biological Process, Molecular Function and Cellular Component.

**Genes down-regulated in OX-FaPRE1 receptacles**

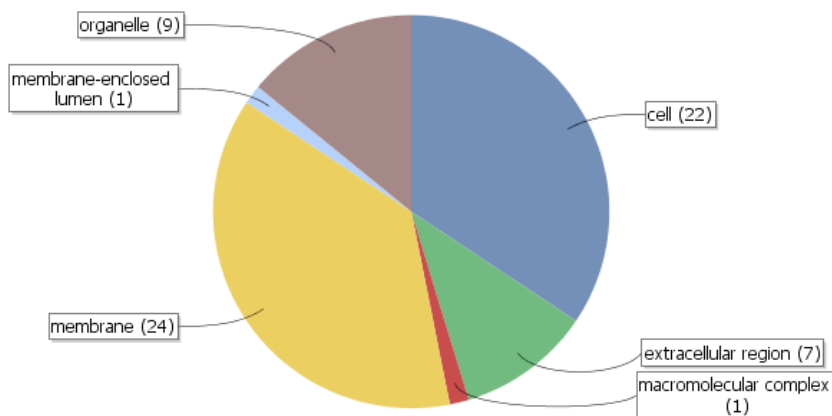
**Go Terms Biological Process (Level 2)**



**Go Terms Molecular Functions (Level 2)**

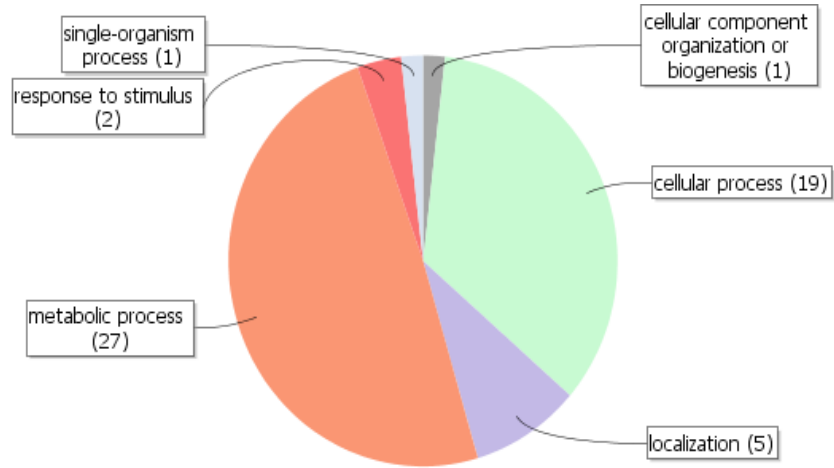


**Go Terms Cellular Component (Level 2)**

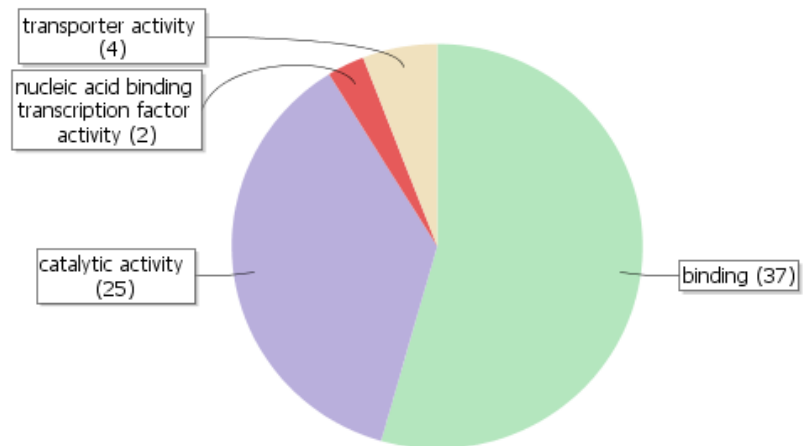


## Genes up-regulated in OX-FaPRE1 receptacles

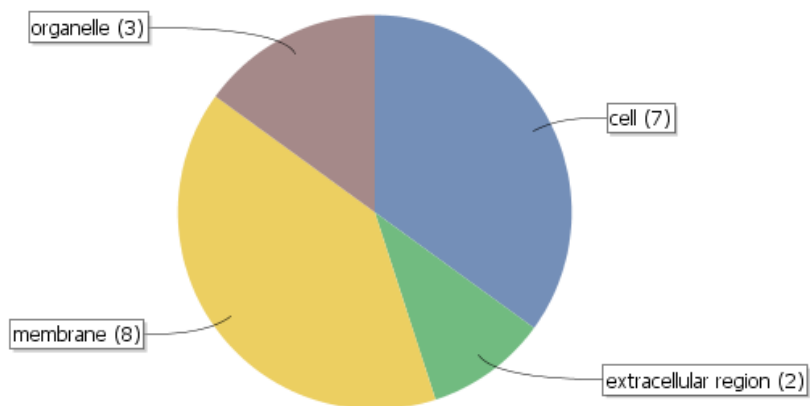
### Go Terms Biological Process (Level 2)



### Go Terms Molecular Functions (Level 2)

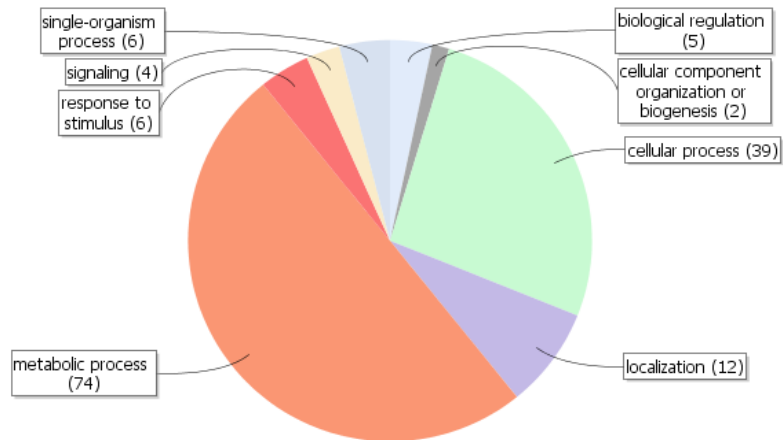


### Go Terms Cellular Component (Level 2)

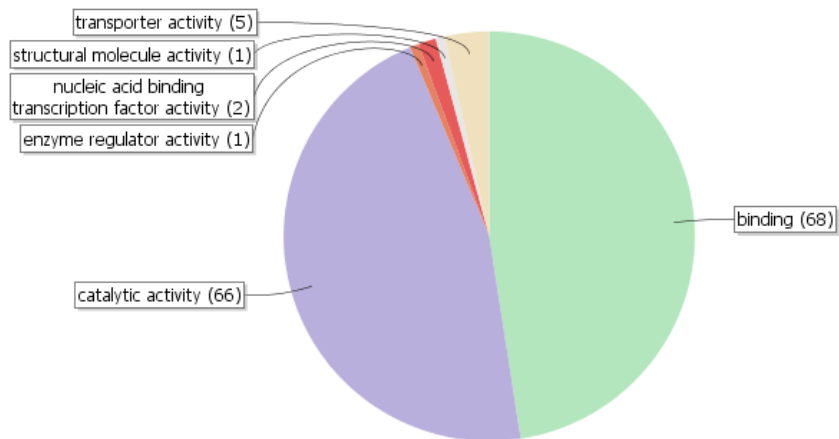


## Genes down-regulated in RNAi-FaPRE1 receptacles

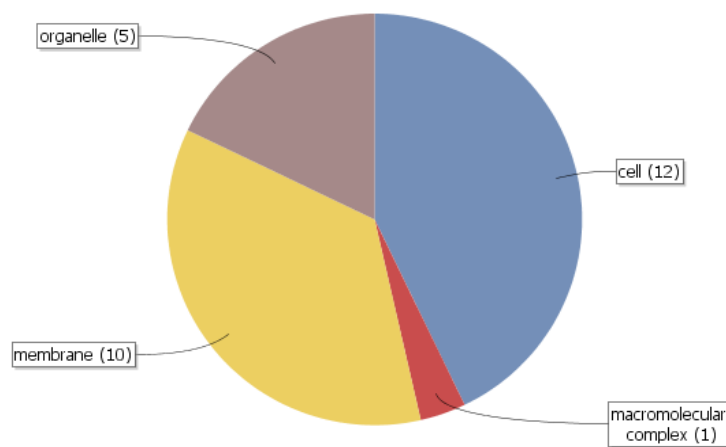
### Go Terms Biological Process (Level 2)



### Go Terms Molecular Functions (Level 2)

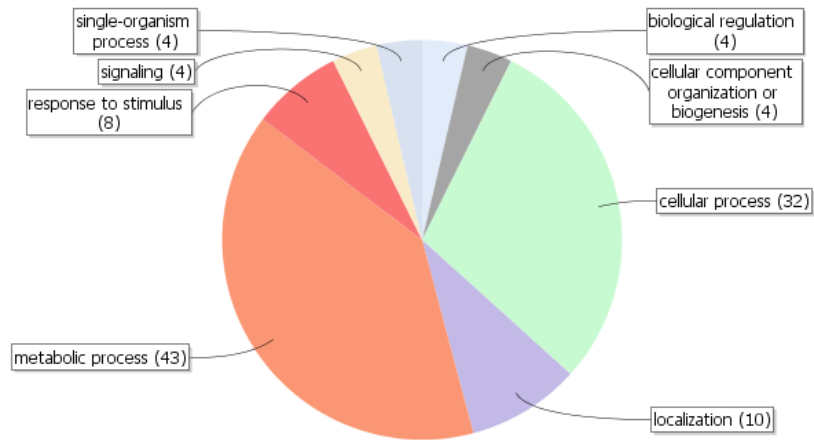


### Go Terms Cellular Component (Level 2)

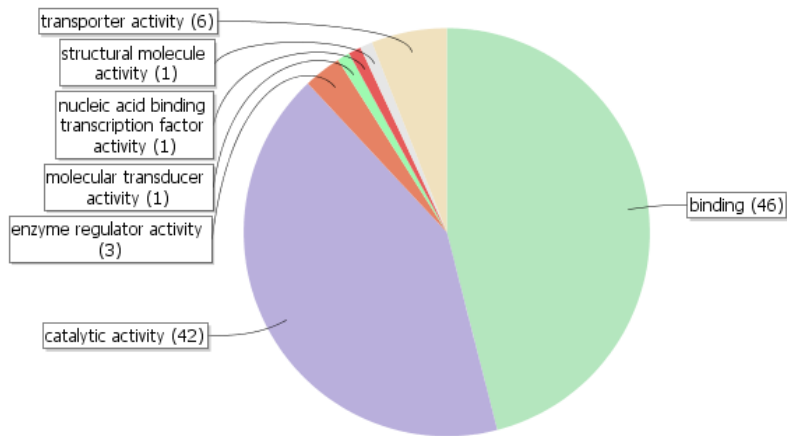


## Genes up-regulated in RNAi-FaPRE1 receptacles

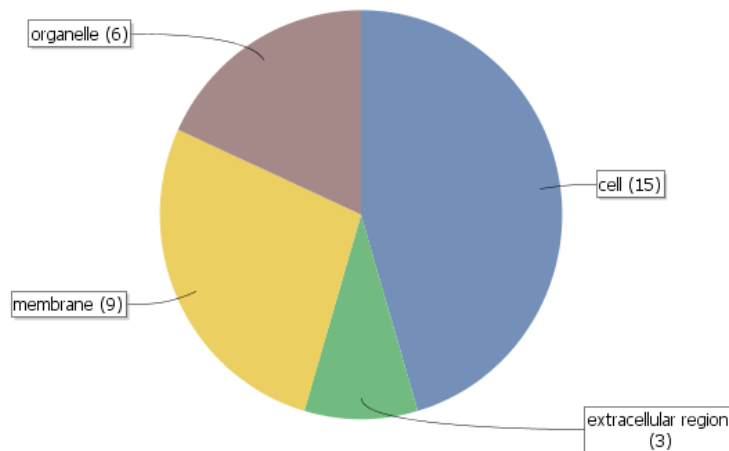
### Go Terms Biological Process (Level 2)



### Go Terms Molecular Functions (Level 2)



### Go Terms Cellular Component (Level 2)



## Additional table 2.

**Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Transiently-Silenced FaPRE1 Fruits and Control Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available in full version only on CD rom version

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>AMINO ACID METABOLISM</b>						
gene19643	2,792777	2,63E-06	Aminomethyltransferase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB77063.1
gene27117	2,834421	1,23E-05	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-106	XP_007042811.1
<b>ASCORBIC ACID METABOLISM</b>						
gene11056	4,619388	2,11E-07	ascorbate oxidase	<i>Fragaria x ananassa</i>	0,00E+00	AGN89526.1
gene08608	28,720889	2,78E-09	L-ascorbate oxidase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB88234.1
<b>BIOTIC STRESS/PLANT DEFENSE</b>						
gene11281	4,030858	2,23E-06	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-52	KEH27184.1
gene02378	2,748226	6,37E-06	Disease resistance RPP13-like protein 4	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-129	EXB41593.1
gene34043	2,776061	3,32E-05	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-87	XP_007014759.1
gene19786	2,751818	8,79E-06	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-87	XP_007014759.1
gene34044	2,915911	2,02E-05	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-89	XP_007014759.1
gene09390	6,451323	4,84E-08	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-142	XP_007036794.1
gene29468	6,886984	2,47E-06	Polyamine oxidase (PAO)	<i>Brassica juncea</i>	3,00E-172	AY188087.1
gene13578	2,746812	1,97E-06	VQ motif-containing protein	<i>Theobroma cacao</i>	9,00E-46	XP_007025594.1
<b>CELL DIVISION CICLE</b>						
gene17583	5,413001	2,20E-06	Cell division control protein 45-like protein	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB99113.1
gene06248	3,521668	3,19E-07	Dynamamin-related protein 1C	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	XM_002284883.1
gene08303	2,988863	7,82E-06	Protein BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1-like protein	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-41	EXB53512.1
<b>CELL PROLIFERATION AND ELONGATION</b>						
gene12714	4,145548	2,75E-06	BREVIS RADIX-like 4 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-151	XP_007012697.1
<b>CELL WALL</b>						
gene04435	5,152955	2,24E-07	Alpha expansin A3	<i>Rosa hybrid</i>	6,00E-144	AB370118.1
gene03754	3,766054	1,92E-07	Alpha-xylosidase	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	XM_002282393.2
gene28696	3,747475	2,83E-06	brassinosteroid-regulated protein BRU1	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	NP_001281066.1
gene15268	8,647196	9,90E-06	fasciclin-like arabinogalactan protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	3,00E-158	ABV27481.1
gene07711	5,215704	7,58E-08	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 16 precursor isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007010508.1

(Table continues on following page)



Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
gene18252	9,660304	5,54E-08	FASCICLIN-like arabinogalactan protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007028043.1
gene14081	4,105322	8,92E-06	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC10654.1
gene19863	2,039916	3,32E-05	Pectinesterase inhibitor	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-51	EXB64629.1
gene12923	8,736570	4,21E-06	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-72	XP_007012560.1
gene32082	6,511390	2,37E-07	Polygalacturonase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	AY128793.1
gene29850	3,610626	1,68E-05	UDP-glucuronate 4-epimerase 1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB94890.1
gene06557	4,901444	5,02E-06	UDP-glucuronate 4-epimerase 6	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB53916.1
gene02631	4,496175	5,02E-08	Xyloglucan glycosyltransferase 12	<i>Glycine max</i>	0,00E+00	XM_003544452.1
<b>CYTOESKELETON</b>						
gene25705	2,768731	3,07E-05	apple allergen profilin (pf-1 gene)	<i>Malus x domestica</i>	1,00E-68	AJ507457.1
gene13266	5,250655	6,56E-06	Tubulin beta-1 chain	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC19132.1
<b>DNA/RNA METABOLISM</b>						
gene26094	10,195382	1,86E-06	70 kDa subunit of replication protein A	<i>Ipomoea il</i>	0,00E+00	BAF64713.1
gene01614	3,811831	2,76E-05	DNA replication licensing factor mcm4-B	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XP_003607002.1
gene32887	3,694854	9,76E-06	retrotransposon protein	<i>Oryza sativa</i>	1,00E-26	ABR26094.1
gene32860	3,724064	1,02E-05	retrotransposon protein	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-25	ABR26094.1
gene21651	6,191684	2,11E-07	Thymidine kinase	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-109	XP_003601580.1
<b>EPIGENETIC CHANGES RELATED PROTEINS</b>						
gene29776	8,487325	1,64E-07	Histone H3	<i>Ricinus communis</i>	6,00E-57	XM_002522456
gene02245	6,433695	4,67E-07	Histone H3	<i>Nicotiana benthamiana</i>	8,00E-67	EF661029
gene28235	4,025880	5,54E-06	Histone H3	<i>Medicago truncatula</i>	6,00E-67	XM_003622933.1
gene23359	7,012253	4,00E-07	Histone H4	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-51	XM_003625433.1
gene23356	6,168164	2,59E-07	Histone H4	<i>Paracentrotus lividus</i>	2,00E-50	Y16587.1
gene13942	3,835264	2,63E-05	Histone H4	<i>Aegilops tauschii</i>	4,00E-50	EMT31824.1
<b>HORMONES</b>						
gene09384	12,769570	1,67E-07	auxin efflux carrier	<i>Rosa canina</i>	0,00E+00	AGY29597.1
gene20938	5,566740	5,31E-06	auxin efflux carrier	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XM_003616551
gene11861	7,101661	6,23E-08	auxin-responsive protein IAA27	<i>Malus domestica</i>	8,00E-158	NP_001280937.1
gene06210	2,883840	1,43E-06	GAI1	<i>Rosa hybrid</i>	0,00E+00	AGK07287.1
<b>KINASES</b>						
gene04899	4,279345	2,42E-06	kinase G11A	<i>Glycine max</i>	0,00E+00	XP_003521068.1
gene26269	7,797236	3,11E-08	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-160	XP_007042511.1
gene32449	2,532251	1,73E-05	Leucine-rich repeat protein kinase family protei	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007040190.1
gene17556	4,243901	5,15E-06	Transmembrane kinase-like 1 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007049845.1
gene00726	2,816647	4,74E-07	Two-component response regulator	<i>Morus notabilis</i>	9,00E-96	EXB82664.1
<b>LIPID METABOLISM</b>						
gene10328	6,531886	1,23E-08	Allene oxide cyclase (AOC)	<i>Camellia sinensis</i>	1,00E-87	HQ889679.1
gene23976	2,577415	6,45E-07	Allene oxide synthase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB37855.1
gene16342	3,681598	5,16E-07	Lipase/lipoxygenase, PLAT/LH2 family protein	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-67	XP_007047990.1
gene00606	6,282579	2,35E-06	lipid transfer protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	8,00E-43	AFH57276.1
gene07315	2,712041	6,74E-06	obtusifoliol-14-alpha-demethylase	<i>Gossypium hirsutum</i>	0,00E+00	ACE06982.1

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>LIPID METABOLISM</b>						
gene15739	3,716978	1,91E-06	Phosphatidic acid phosphatase-related protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-113	XP_007023211.1
<b>PHOTORECEPTORS AND PHOTOTROPISM</b>						
gene01553	9,046802	4,89E-06	phototropic-responsive NPH3-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-117	NM_148168
<b>PRIMARY METABOLISM</b>						
gene18774	2,570208	2,71E-05	concanavalin A-like lectin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-64	NP_195729.1
gene09648	3,359194	1,61E-07	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	<i>Theobroma cacao</i>	7,00E-95	XP_007027285.1
gene24430	3,123102	4,00E-06	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic-like	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	NP_001280847.1
gene10417	5,530052	1,38E-05	Glutamate dehydrogenase 1 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007030721.1
gene07876	3,489598	1,75E-06	glycosyltransferase	<i>Pyrus communis</i>	0,00E+00	FJ854495.1
<b>PROTEIN METABOLISM</b>						
gene10249	3,389740	8,96E-07	Ankyrin repeat family protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-65	XP_007036288.1
gene12109	7,914630	1,03E-06	Aspartic proteinase nepenthesin-1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC16665.1
gene33790	4,463402	7,85E-06	ribosomal protein L2 (rpl2) and ribosomal protein L23 (rpl23) genes	<i>Spiraea tomentosa</i>	2,00E-125	HQ664572.1
gene04073	5,238414	1,41E-06	Serine carboxypeptidase	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007045135.1
gene07638	5,647905	1,40E-06	Subtilisin-like protease	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB39297.1
gene02604	2,691135	1,13E-05	U-box domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002302398.1
gene04058	2,367629	7,62E-07	U-box domain-containing protein 11	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC06053.1
<b>RECEPTORS</b>						
gene07742	4,769682	6,91E-07	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007046741.1
gene13883	2,139373	1,87E-05	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007033525.1
gene29591	2,356754	2,11E-05	Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM2	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB29045.1
gene25908	9,684565	2,08E-05	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007031833.1
gene07735	2,915175	4,79E-07	Receptor-like protein kinase HSL1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC46783.1
<b>REDOX RELATED PROTEINS</b>						
gene21247	5,582305	1,98E-08	Monocopper oxidase-like protein SKS1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC08927.1
gene03992	2,204368	4,28E-05	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-62	XP_007046186.1
gene00677	7,636909	9,12E-09	NHL domain-containing protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007044573.1
gene31145	3,967863	2,81E-05	peroxidase	<i>Pyrus pirifolia</i>	1,00E-100	AFY97685.1
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene35023	2,697536	2,94E-07	UDP-glycosyltransferase	<i>Cicer arietinum</i>	2,00E-159	AGU14093.1
<b>SIGNALING</b>						
gene22671	3,004387	7,54E-08	C2 domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_006381053.1
gene25967	3,356388	1,03E-05	IQ domain-containing protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-93	XP_003609033.1
gene31425	2,705918	4,83E-06	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 2	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC01093.1
gene30942	4,686120	2,11E-07	Serine/threonine protein phosphatase 2A 57 kDa regulatory subunit B' iota isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007013281.1
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>						
gene02381	2,920163	1,40E-06	Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-58	XP_007025601.1
gene13309	2,251621	2,54E-05	FAR1-related sequence 5 isoform 3	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-131	XP_007038613.1
gene23963	2,418359	9,86E-06	WRKY family transcription factor	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-178	XP_007049086.1

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>TRANSPORTER ACTIVITY</b>						
gene28306	8,464138	5,69E-07	ammonium transporter	<i>Malus hupehensis</i>	0,00E+00	AEY75246.1
gene31725	3,304036	7,43E-06	Heavy metal transport/detoxification domain-containing protein	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-85	XP_007048040.1
gene18667	3,682858	1,93E-07	Ras-related protein RABA3	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-131	EXB83856.1
gene17470	2,403734	8,95E-06	Ras-related protein RABA5c	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-123	EXB84505.1
gene21825	3,803731	7,82E-06	Sec14 cytosolic factor	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC04414.1
gene16515	4,180604	4,55E-05	Sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-145	XP_007030630.1
gene32625	4,618963	2,60E-06	Vacuolar iron transporter family protein	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-91	XP_007019467.1
gene07453	3,333213	1,41E-06	Xylulose 5-phosphate/phosphate translocator	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB70637.1
<b>TURGOR</b>						
gene07369	3,190841	4,58E-06	Aquaporin	<i>Camellia sinensis</i>	2,00E-120	AHC32017.1
gene23712	7,753633	7,36E-09	Aquaporin (PIP2;1)	<i>Rosa hybrid</i>	5,00E-180	EU572717.1
gene25767	13,680388	5,93E-07	Aquaporin (TIP2;1)	<i>Quercus petraea</i>	9,00E-131	AFH36343.1
<b>MISCELLANEOUS</b>						
gene06453	3,543832	2,46E-05	CASP-like protein	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-36	XP_007038092.1
gene28997	3,649117	1,19E-05	epidermal patterning factor-like protein 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,00E-31	NP_001031641.1
gene25654	2,427160	2,93E-06	integral membrane family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	5,00E-77	XP_002299731.2
gene33792	5,232839	1,68E-06	inverted repeat region IRB 1-27	<i>Fragaria x ananassa</i>	4,00E-34	DQ768221.1
gene32959	2,375780	4,56E-05	mitochondrial DNA	<i>Nicotiana tabacum</i>	3,00E-111	BA000042.1
gene20050	2,869419	9,92E-06	PHLOEM PROTEIN	<i>Malus domestica</i>	3,00E-60	NP_001280747.1
gene32318	2,671290	4,29E-05	Ycf49-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-61	XP_003611209.1
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene32909	4,194481	4,69E-05	Uncharacterized protein	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-15	AES69826.2
gene07007	4,161081	2,60E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	6,00E-43	XP_007223508.1
gene21538	3,968371	2,64E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	5,00E-85	XP_007205953.1
gene25582	3,764128	9,22E-06	Uncharacterized protein	<i>Glycine max</i>	1,00E-16	XR_137670.1
gene09165	3,331562	3,56E-05	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	3,00E-156	XP_002264858.1
gene23855	3,166937	4,36E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	XP_007206473.1
gene05652	2,963640	5,35E-06	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	1,00E-141	XP_008342209.1
gene13078	2,733460	1,35E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	2,00E-55	XP_007208445.1
gene27210	2,616107	1,83E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	5,00E-94	XP_007211356.1
gene07773	2,342719	4,03E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	7,00E-171	XP_007208105.1
gene31281	2,248279	4,02E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunum mume</i>	8,00E-103	XP_008226667.1
gene30909	2,128025	4,21E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	2,00E-148	XP_008242663.1
gene26490	2,055004	4,33E-05	Uncharacterized protein	<i>Glycine max</i>	5,00E-59	XM_003555571.1
gene25773	2,033332	1,52E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	XP_007209905.1
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene23953	8,617558	2,14E-08	No homology			
gene32880	6,389187	1,90E-05	No homology			
gene10496	5,606973	2,77E-07	No homology			
gene32738	4,731854	8,37E-06	No homology			

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene10495	4,486745	6,59E-06	No homology			
gene24520	4,379670	1,58E-05	No homology			
gene14205	3,742801	3,63E-05	No homology			
gene05450	3,440905	1,82E-05	No homology			
gene17362	3,203956	2,20E-05	No homology			
gene03107	3,200235	3,03E-05	No homology			
gene26796	3,147401	4,68E-05	No homology			
gene15006	2,850581	4,05E-05	No homology			
gene10483	2,254796	7,80E-06	No homology			
<b>DOWN regulated</b>						
<b>AMINO ACID METABOLISM</b>						
gene19242	-8,599299	1,21E-08	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-127	NM_128618.3
gene04128	-9,094685	3,71E-07	anthranilate synthase, beta subunit, ASB1	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-122	XM_002314725.1
gene01135	-3,127327	7,53E-06	aspartokinase-homoserine dehydrogenase	<i>Glycine max</i>	0,00E+00	NM_001250544
gene18910	-7,904421	1,65E-08	beta-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase 1 (CHY1)	<i>Arabidopsis lyrata</i>	5,00E-111	XM_002865047.1
<b>AROMA</b>						
gene07931	-11,376657	8,95E-07	alcohol acyl transferase (FaAAT2)	<i>Fragaria x ananassa cv. Chandler</i>	0,00E+00	JN089766.1
<b>BIOTIC STRESS/PLANT DEFENSE</b>						
gene25088	-2,400505	4,40E-05	Disease resistance protein	<i>Aegilops tauschii</i>	5,00E-52	EMT24222.1
gene17249	-3,185420	7,95E-06	Pathogenesis-related homeodomain protein	<i>Morus notabilis</i>	8,00E-162	EXB31007.1
gene32348	-3,121196	9,75E-07	PGR5 protein 1A	<i>Glycine max</i>	5,00E-140	XM_003549825.1
gene31620	-2,326449	1,76E-05	Salicylic acid carboxyl methyltransferase	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-20	XM_003629364.1
gene21955	-6,404059	1,21E-08	thaumatin-like protein	<i>Pyrus pirifolia</i>	7,00E-106	ACN97417.1
<b>CELL DIVISION CYCLE</b>						
gene23936	-2,403150	7,33E-06	septum-promoting GTP-binding protein 1-like	<i>Glycine max</i>	1,00E-93	XM_003539821.1
<b>CELL WALL</b>						
gene34867	-23,490415	9,79E-08	endo-beta-1,4-glucanase	<i>Fragaria x ananassa</i>	4,00E-45	AJ414709.1
gene12025	-2,434341	3,83E-05	Exopolygalacturonase clone GBGE184 precursor family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	9,00E-116	XM_002301453
gene34259	-11,226925	5,06E-07	FaEG1 gene for endo-beta-1,4-glucanase	<i>Fragaria x ananassa</i>	2,00E-55	AJ414709.1
gene16186	-2,120045	3,35E-05	polygalacturonase-like	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	XM_002274102.1
gene31030	-4,316248	1,80E-06	rhamnogalacturonate lyase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_127827.3
<b>DNA/RNA METABOLISM</b>						
gene26763	-2,486132	8,28E-07	exonuclease V-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	7,00E-132	XP_004251259.1
gene32181	-4,169201	2,54E-05	Exosome complex exonuclease RRP40	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-112	XP_003613959.1
gene01264	-2,047025	1,96E-05	FACT complex subunit SSRP1	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	KEH40157.1
gene20961	-2,918860	2,17E-05	High mobility group B1	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-11	XP_007009011.1
gene31205	-3,765196	1,93E-06	histidyl-tRNA synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_111144.5

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>DNA/RNA METABOLISM</b>						
gene06392	-2,956759	1,51E-05	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007037908.1
gene08098	-2,763339	1,05E-05	structural maintenance of chromosomes protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	KEH42525.1
gene34475	-2,811691	4,21E-05	ty3-gypsy retrotransposon protein	<i>Cucumis melo</i>	8,00E-49	ADN34247.1
gene02712	-2,370512	2,30E-05	ty3-gypsy retrotransposon protein	<i>Cucumis melo</i>	3,00E-60	ADN34247.1
gene29715	-3,928479	2,44E-05	ty3-gypsy retrotransposon protein	<i>Cucumis melo</i>	1,00E-79	ADN34247.1
gene26494	-2,352832	4,70E-06	XH/XS domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002316281.2
<b>ENERGY AND PHOTOSYNTHETIC APPARATUS</b>						
gene19737	-2,719501	4,61E-06	alternative oxidase 4 (IM)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,00E-139	NM_118352.3
gene30816	-2,243239	1,46E-05	chlororespiratory reduction 6 (CRR6)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-104	NM_130358.3
gene16103	-2,288193	2,85E-05	cytochrome b5 isoform Cb5-D family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-46	XM_002314961
gene05994	-3,635042	1,25E-05	D-glycerate 3-kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-175	NM_179581.2
<b>KINASES</b>						
gene22806	-2,383144	1,29E-05	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB75643.1
gene06226	-6,736961	1,63E-07	Pantothenate kinase	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-160	XM_003601211.1
gene10659	-3,362627	2,50E-06	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 5	<i>Glycine max</i>	4,00E-94	XM_003517865.1
gene23153	-3,461279	2,74E-05	Protein kinase and PP2C-like domain-containing protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XM_003590198
<b>LIPID METABOLISM</b>						
gene25061	-2,498978	2,64E-06	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG-like	<i>Glycine max</i>	3,00E-125	XM_003518929.1
gene18789	-3,826149	5,51E-07	alpha-carboxyltransferase	<i>Jatropha curcas</i>	0,00E+00	GQ845013.1
gene22011	-4,094889	2,11E-05	GDSL esterase/lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-103	NM_102626.3
gene19498	-3,306102	3,10E-05	malonyl-CoA decarboxylase family protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	2,00E-162	XM_002872641.1
gene13454	-2,756992	3,95E-06	omega-3 desaturase	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	AF517831.2
gene30403	-2,603225	8,21E-06	sphingolipid delta-4 desaturase (DES-1-LIKE)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_116731.3
gene21537	-3,572128	2,88E-05	stearoyl-ACP desaturase (SAD)	<i>Vernicia montana</i>	0,00E+00	EU072353.1
gene03716	-4,332605	1,36E-06	thioesterase family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,00E-64	NM_105497.4
gene28317	-3,091566	9,25E-06	Triglyceride lipases	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007034560.1
<b>PRIMARY METABOLISM</b>						
gene01341	-6,392079	5,73E-08	alcohol dehydrogenase	<i>Prunus armeniaca</i>	6,00E-142	EU395433.1
gene01893	-3,567779	4,74E-07	aminoacrylate hydrolase RutD-lik	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	XM_002279862.2
gene06649	-2,686721	4,60E-06	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007035420.1
gene23557	-3,641982	3,79E-05	Malate dehydrogenase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB39453.1
gene00277	-7,038642	3,49E-07	nodulin 26-like intrinsic protein	<i>Fragaria chiloensis</i>	0,00E+00	GQ869535.1
gene02878	-4,382668	1,46E-05	nodulin 26-like intrinsic protein	<i>Fragaria chiloensis</i>	1,00E-148	ADK56129.1
gene04087	-2,874896	1,12E-05	O-fucosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_178257.1
gene13359	-3,057874	3,60E-07	Phosphoglucomutase	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002318262.1
gene12064	-2,292009	2,40E-05	pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,00E+00	XM_004236102.1
gene22813	-3,598511	9,02E-07	Pyruvate dehydrogenase	<i>Glycine max</i>	6,00E-175	XM_003533767.1
gene18142	-3,317131	8,08E-07	sucrose phosphate phosphatase	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	AAS79792.1
gene24674	-6,797594	1,27E-06	terpene synthase	<i>Prunus cerasoides var. campanulata</i>	0,00E+00	AIC76501.1
gene24860	-4,526834	2,80E-05	trehalose-phosphate synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_106505.4

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>PRIMARY METABOLISM</b>						
gene04078	-2,552705	2,54E-05	Xylose isomerase	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XM_003610131.1
<b>PROTEIN METABOLISM</b>						
gene10081	-2,435883	1,68E-05	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-62	NM_125180.2
gene12455	-2,304212	1,64E-05	30S ribosomal protein	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-125	EXB78385.1
gene28341	-3,769934	2,68E-07	40S ribosomal protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-65	XM_003630607
gene08027	-2,711682	6,72E-06	Ankyrin repeat domain-containing protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XM_003624606.1
gene06629	-4,105088	3,31E-06	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein isoform 3	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007034164.1
gene11393	-2,859948	1,08E-05	Metallopeptidase	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007012898.1
gene10008	-3,806580	3,33E-08	methionine sulfoxide reductase	<i>Fragaria x ananassa</i>	2,00E-116	Z69596.2
gene23580	-2,061419	5,43E-06	OTU Cysteine proteinases superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-109	XP_007010219.1
gene32734	-3,993817	1,19E-05	ribosomal protein L2	<i>Clidemia dentata</i>	8,00E-84	AEK71452.1
gene18503	-50,015554	1,08E-08	SKP1-interacting partner 15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_106343.3
gene18505	-57,435316	7,36E-09	SKP1-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-08	XM_003616811.1
gene30186	-2,675674	9,05E-06	ubiquitin fusion degradation UFD1-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-151	NM_201828.3
gene32519	-2,523701	1,83E-06	Ubiquitin-conjugating enzyme	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-102	XP_007040285.1
gene31679	-3,773353	7,49E-07	ubiquitin-like protein	<i>Artemisia annua</i>	5,00E-11	GQ901904.1
gene03207	-2,022307	4,57E-05	Ubiquitin-protein ligase-like protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-52	XP_007020038.1
<b>RECEPTORS</b>						
gene00968	-2,773417	3,90E-05	receptor lectin kinase	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-43	AES90561.2
<b>REDOX RELATED PROTEINS</b>						
gene23864	-2,656622	4,74E-05	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	7,00E-141	XP_007047361.1
gene30780	-18,442613	7,58E-08	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007013607.1
gene30782	-4,270396	3,10E-05	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-124	XP_007013607.1
gene02068	-2,945123	3,03E-05	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-180	XP_007013257.1
gene22147	-5,246864	4,61E-06	aldo/keto reductase (AKR)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0,00E+00	AY703448.1
gene01181	-2,124265	3,89E-05	Cbs domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	6,00E-130	XP_003616096.1
gene08606	-3,125261	3,69E-06	maoC-like dehydratase domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	5,00E-172	XP_002307764.1
gene17390	-2,760256	5,39E-06	Monocopper oxidase-like protein SKU5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_117312.3
gene28407	-12,116098	2,64E-06	Quinone oxidoreductase	<i>Fragaria x ananassa</i>	7,00E-102	AY048861.1
gene00649	-6,785469	3,93E-05	Quinone oxidoreductase	<i>Glycine max</i>	3,00E-29	XM_003531961.1
gene28406	-3,616573	1,07E-05	Quinone oxidoreductase	<i>Fragaria x ananassa</i>	0,00E+00	AAL06644.1
gene21391	-3,729909	1,90E-05	Quinone oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-151	AK221446.1
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene13004	-2,139657	6,96E-06	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	<i>Malus x domestica</i>	0,00E+00	EF580921.1
gene29959	-3,689450	1,37E-07	Cytochrome P450	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-134	XP_007045776.1
gene29956	-3,169622	3,19E-06	Cytochrome P450	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XM_002315974.1
gene03027	-2,767585	2,06E-05	Cytochrome P450	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC36468.1
gene04546	-2,257749	1,56E-05	Cytochrome P450	<i>Morus notabilis</i>	6,00E-106	EXB44887.1
gene29958	-3,398609	8,55E-07	Cytochrome P450	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB44887.1
gene15176	-3,410986	1,78E-05	dihydroflavonol 4-reductase	<i>Rosa chinensis</i>	4,00E-174	AHF58604.1

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene24676	-6,887442	1,22E-06	linalool synthase	<i>Actinidia arguta</i>	1,00E-168	GQ338153.1
gene30669	-6,624001	1,97E-06	linalool synthase (LIS)	<i>Malus x domestica</i>	0,00E+00	JX848734.1
gene12851	-2,316568	5,30E-06	spermine synthase	<i>Malus sylvestris</i>	7,00E-25	AB204520
gene09934	-10,334348	7,44E-07	Vinorine synthase	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-95	XM_003601793.1
<b>SIGNALING</b>						
gene13353	-3,052490	2,63E-06	C2 domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XM_006376379
gene09729	-2,429141	4,88E-06	C2 domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XM_006376379
gene31011	-3,987542	5,79E-07	Calmodulin-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-42	XM_003602046
gene20232	-3,678175	1,48E-05	GTP-binding family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	9,00E-93	XP_002310030.1
gene12855	-5,614100	4,79E-07	phosphatase type 2C	<i>Lotus japonicus</i>	1,00E-74	AF092431.1
gene07367	-3,193715	5,75E-07	SnRK2 calcium sensor (SCaS)	<i>Nicotiana glauca</i>	1,00E-175	FJ882981.1
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>						
gene25544	-2,322523	1,77E-06	BZIP domain class transcription factor	<i>Malus x domestica</i>	0,00E+00	HM122472.1
gene10713	-2,173537	1,44E-05	eyes absent-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-54	AES90820.2
gene16548	-2,129103	6,21E-06	MADS-box family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-10	XM_002300073
gene03865	-2,245704	2,84E-06	myb transcription factor (myb5 gene)	<i>Humulus lupulus</i>	2,00E-70	FR751555.1
gene09412	-2,269120	1,33E-05	Myb-like protein	<i>Morus notabilis</i>	5,00E-162	EXB69122.1
gene04636	-2,286699	4,24E-05	NAC domain protein	<i>Malus hupehensis</i>	3,00E-58	AGS08769.1
gene12497	-2,117888	1,83E-06	OBP3-responsive gene 4 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-101	XP_007012642.1
gene31413	-5,398178	5,44E-07	R2R3 MYB transcription factor (MYB10)	<i>Fragaria x ananassa</i>	0,00E+00	ABX79947.1
gene25060	-5,016380	4,50E-05	R2R3-like myb transcription factor (TT2)(myb10 gene)	<i>Rosa rugosa</i>	6,00E-46	FR828543.1
gene09407	-5,616460	1,43E-07	transcription factor (MYB1)	<i>Fragaria chiloensis</i>	8,00E-116	GQ867222
gene28720	-6,545914	1,04E-07	WRKY transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>	5,00E-62	XM_003617375.1
gene12408	-2,092610	4,28E-05	YL1 nuclear family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-130	XP_006370389.1
<b>TRANSPORTER ACTIVITY</b>						
gene16428	-10,243553	2,11E-07	acyl carrier protein	<i>Fragaria vesca</i>	1,00E-94	AJ001446.1
gene30679	-3,700378	1,60E-05	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD5	<i>Vitis vinifera</i>	3,00E-54	XM_003635266.1
gene04460	-6,748077	3,65E-08	amino acid transporter	<i>Populus trichocarpa</i>	7,00E-171	XM_002323825.1
gene27413	-3,195944	1,92E-07	Charged multivesicular body protein	<i>Ricinus communis</i>	2,00E-135	XM_002518568
gene11349	-2,422243	9,32E-06	clathrin adaptor complex small chain family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	6,00E-60	XP_002308286.1
gene28009	-5,329658	6,64E-06	cystinosin	<i>Glycine max</i>	5,00E-45	XM_003547635.1
gene28014	-8,940767	8,06E-08	cystinosin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-116	NM_123432.3
gene09478	-3,752942	7,87E-07	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13 family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-17	XM_002300484
gene01912	-3,495562	3,10E-05	oligopeptide transporter OPT family	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XM_002303648.1
gene01279	-2,287222	3,18E-05	plasma membrane H <sup>+</sup> ATPase	<i>Nicotiana glauca</i>	8,00E-143	AAA34099.1
gene18824	-3,539842	3,06E-05	proton-dependent oligopeptide transport family protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	3,00E-28	XP_002881563.1
gene02110	-2,413226	1,93E-05	ras-related protein RHN1-like	<i>Glycine max</i>	1,00E-97	XM_003524342.1
gene10390	-2,487284	1,85E-05	Syntaxin of plants 131 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-141	XP_007030062.1
gene16947	-2,312794	2,42E-06	syntaxin/T-SNARE family protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-106	AES92325.2

(Table continues on following page)

Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>MISCELLANEOUS</b>						
gene24805	-2,055408	4,57E-05	acyl-activating enzyme	<i>Cannabis sativa</i>	2,00E-179	AFD33358.1
gene17822	-3,786335	2,68E-07	autophagy-related protein 8f-like, transcript variant 2	<i>Vitis vinifera</i>	2,00E-65	XM_002280041
gene30876	-2,641403	2,68E-06	inorganic pyrophosphatase 2-like	<i>Glycine max</i>	4,00E-86	XM_003531579.1
gene27838	-2,600768	2,83E-06	Isomerase	<i>Medicago truncatula</i>	9,00E-117	XM_003590624.1
gene17083	-2,170079	1,26E-05	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007041651.1
gene30404	-3,977164	1,89E-05	RING finger protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-73	XM_003637350.1
gene19545	-3,619023	3,95E-07	RNA (guanine-9-)-methyltransferase domain-containing protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-105	XM_003594254.1
gene24949	-2,275628	2,22E-05	RNA-binding ASCH domain protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-65	NP_566202.1
gene18229	-5,657138	1,62E-05	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9E-146	NM_120332.3
gene30813	-3,734470	2,11E-07	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	<i>Zea mays</i>	3,00E-136	EU955451.1
gene11295	-2,782538	1,86E-05	Senescence/dehydration-associated protein-related	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-134	XP_007013036.1
gene30253	-3,080886	3,91E-05	transducin/WD40 repeat protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-53	KEH42063.1
gene21168	-2,435408	1,69E-05	WD-repeat protein	<i>Ricinus communis</i>	0,00E+00	XM_002510961.1
gene10350	-8,070684	6,84E-07	Zinc finger protein	<i>Brassica rapa</i>	2,00E-13	HM579884.1
gene11664	-2,071425	6,33E-06	zinc knuckle	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_124371
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene16424	-10,183503	1,06E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	0,00E+00	XP_008218218.1
gene12443	-9,910496	1,10E-06	Uncharacterized protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-174	NM_113710.2
gene06225	-7,520233	1,90E-06	Uncharacterized protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-89	NM_100338.2
gene13773	-5,628394	2,78E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	1,00E-14	XP_007206870.1
gene12074	-5,043038	4,27E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	7,00E-62	XP_008219384.1
gene02383	-4,366834	1,65E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	5,00E-145	XP_008225105.1
gene32297	-3,491478	1,86E-06	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	FQ380191.1
gene01782	-3,441244	4,10E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	1,00E-58	XP_008236230.1
gene24118	-3,420385	4,29E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	XP_007204428.1
gene23219	-3,203788	4,41E-07	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	2,00E-79	XP_008233358.1
gene18647	-3,121305	1,67E-05	Uncharacterized protein	<i>Ricinus communis</i>	3,00E-22	XM_002527212.1
gene01265	-3,020928	3,45E-06	Uncharacterized protein	<i>Ricinus communis</i>	6,00E-110	XM_002509850
gene14339	-2,984691	9,32E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	0,00E+00	XP_008245415.1
gene18189	-2,938660	1,01E-05	Uncharacterized protein	<i>Fragaria x ananassa</i>	1,00E-144	DQ180308.1
gene11396	-2,693469	9,36E-06	Uncharacterized protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-124	XM_003620833
gene31208	-2,674282	2,22E-05	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	8,00E-112	XP_008365795.1
gene28917	-2,445844	1,13E-05	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	2,00E-19	AM465773
gene12931	-2,443937	1,14E-05	Uncharacterized protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-100	AY035083.1
gene30851	-2,383567	9,17E-06	Uncharacterized protein	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-64	XM_002308180
gene27014	-2,286026	3,05E-05	Uncharacterized protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007048545.1
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene20967	-10,205961	3,97E-09	No homology			
gene06218	-9,448123	1,20E-06	No homology			
gene10349	-6,081714	4,32E-07	No homology			

(Table continues on following page)



Gene ID	RNAi-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene10506	-2,823787	5,44E-06	No homology			
gene27217	-2,760110	5,55E-06	No homology			
gene02039	-2,673451	9,61E-06	No homology			

### Additional table 3.

**Total Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Transiently-Silenced FaPRE1 Fruits and Control Fruits Agroinfiltrated with the Empty pFRN Vector.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

**Additional table 4.****Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Stably-Overexpressing FaPRE1 Fruits and No-Transgenics Control Fruits.**

Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available in full version only on CD rom version

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>BIOTIC STRESS/PLANT DEFENSE</b>						
gene03835	4,447549	3,18E-05	Agmatine coumaroyltransferase	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-130	EXB38115.1
gene28370	3,403646	1,16E-06	disease resistance family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	8,00E-114	XP_002310744.2
gene28363	2,600212	6,08E-05	disease resistance family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-41	XP_002310744.2
gene15979	4,042660	4,11E-06	disease resistance family protein	<i>Triticum urartu</i>	4,00E-92	EMS52026.1
gene28364	4,562418	3,66E-07	RPW8.2-like protein	<i>Vitis vinifera</i>	5,00E-38	AHZ63736.1
gene15945	2,996645	1,91E-05	Serine/threonine-protein kinase PBS1 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007023373.1
gene32662	2,418330	4,92E-05	TIR-NBS-LRR	<i>Rosa rugosa</i>	1,00E-102	AFP55534.1
<b>CELL DIVISION CYCLE</b>						
gene27811	2,210931	4,49E-05	cyclin-dependent protein kinase	<i>Ricinus communis</i>	3,00E-79	XM_002520696.1
gene22666	2,504816	4,38E-05	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-122	XP_007028948.1
<b>CELL WALL</b>						
gene26801	4,963926	1,02E-05	Beta-glucosidase 13	<i>Vitis vinifera</i>	1,00E-90	XM_002276808.2
gene21343	4,314492	1,66E-06	expansin (Exp 2)	<i>Fragaria × ananassa</i>	0,00E+00	AF159563.1
gene04644	2,931684	6,31E-06	glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase family protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	AES89986.2
gene10004	4,996428	7,06E-05	Pectase lyase	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	EF568780.1
gene17555	4,594835	9,34E-06	pectate lyase (FaPL)	<i>Fragaria × ananassa</i>	0,00E+00	U63550.1
gene19553	3,014002	3,36E-05	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 3	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	ACD03227.1
<b>DNA/RNA METABOLISM</b>						
gene21114	3,344509	3,68E-05	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-17	XP_007019583.1
gene30629	3,226205	3,10E-06	Minichromosome maintenance 10 isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-48	XP_007041846.1
gene30384	3,402650	5,05E-07	mitochondrial transcription termination factor family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-120	NP_181009.1
gene12288	2,967034	1,96E-07	Pre-mRNA-splicing factor 38B	<i>Medicago truncatula</i>	5,00E-137	XM_003616146
gene05677	2,048739	9,92E-06	RNA recognition motif-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-33	NP_180012.2
<b>ENERGY AND PHOTOSYNTHETIC APPARATUS</b>						
gene34666	3,079963	1,10E-05	chlorophyll a/b-binding protein	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	7,00E-179	AAB61238.1
gene24993	2,996876	5,45E-05	Chlorophyll a-b binding protein 13	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-40	EXB89638.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>ENERGY AND PHOTOSYNTHETIC APPARATUS</b>						
gene12727	2,179520	2,50E-05	chloroplast photosystem II subunit X	<i>Vigna radiata</i>	9,00E-27	ACO24551.1
<b>HORMONES</b>						
gene32595	6,535588	1,22E-05	Auxin-induced protein-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	5,00E-17	XP_003607107.1
gene15036	2,019219	6,30E-05	Ethylene-responsive transcription factor	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-55	EXB38642.1
gene08194	2,301072	8,37E-06	Indole-3-acetic acid inducible 14 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-96	XP_007050421.1
gene14862	17,860890	4,54E-08	SAUR family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	4,00E-45	XM_002310820.1
gene13907	10,677734	1,94E-06	SAUR family protein	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-68	XP_007041982.1
gene26161	7,176558	3,30E-06	SAUR-like auxin-responsive protein family	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-38	XP_007041987.1
gene13766	4,901870	2,20E-05	SAUR-like auxin-responsive protein family	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-61	XP_007041983.1
gene16992	2,888350	2,89E-06	Somatic embryogenesis receptor kinase 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007014242.1
gene10813	2,270101	2,22E-05	Zeaxanthin epoxidase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC02067.1
<b>KINASES</b>						
gene16699	3,777733	5,29E-06	kinase	<i>Ricinus communis</i>	2,00E-26	XP_002513567.1
<b>LIPID METABOLISM</b>						
gene20810	2,034527	5,89E-05	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase PASTICCINO 2	<i>Gossypium hirsutum</i>	9,00E-98	AHA62438.1
gene01141	3,641287	9,17E-07	GDSL esterase/lipase	<i>Medicago truncatula</i>	7,00E-179	XP_003601542.1
gene09118	3,418953	1,31E-05	subtilisin-like protease preproenzyme	<i>Nicotiana tabacum</i>	4,00E-152	GQ249168.1
<b>PHOTORECEPTORS AND PHOTOTROPISM</b>						
gene01553	6,015940	3,52E-05	phototropic-responsive NPH3-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-117	NM_148168
gene25992	2,426154	4,20E-05	phytochrome kinase substrate-related family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-55	XP_006374469.1
<b>PRIMARY METABOLISM</b>						
gene18106	2,226600	6,13E-05	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-46	XP_007027213.1
gene19758	2,290785	1,38E-05	Early nodulin-2	<i>Glycine max</i>	1,00E-45	XR_136839.1
<b>PROTEIN METABOLISM</b>						
gene08318	2,758049	5,53E-07	Acid phosphatase 1	<i>Morus notabilis</i>	5,00E-110	EXB45998.1
gene15915	4,866611	3,30E-05	Eukaryotic aspartyl protease family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007023525.1
gene07389	2,144341	3,49E-05	F-box	<i>Prunus mume</i>	1,00E-65	BAC66622.1
gene29556	2,091777	3,17E-05	F-box family protein	<i>Theobroma cacao</i>	9,00E-35	XP_007035345.1
gene12239	3,813490	2,54E-07	F-box protein	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-58	EXC20948.1
gene16659	2,287978	5,82E-06	Protein prenyltransferase alpha subunit repeat-containing protein 1	<i>Morus notabilis</i>	3,00E-153	EXB93160.1
gene09451	2,344773	6,05E-05	Ribosomal protein S24/S35, mitochondrial	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-17	XP_007021510.1
gene13873	2,869994	9,69E-06	RING/U-box superfamily protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-81	XP_007033540.1
gene30474	2,174088	3,86E-05	RING-H2 finger protein ATL18	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-32	EXB40454.1
gene09232	2,282958	2,82E-05	RING-H2 zinc finger protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-74	AES95832.2
gene10323	2,972630	1,79E-05	Rhomboid protease gluP	<i>Morus notabilis</i>	6,00E-115	EXB97174.1
<b>RECEPTORS</b>						
gene29587	2,318610	4,78E-05	Anti-Muellerian hormone type-2 receptor	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-45	XP_007046975.1
gene31566	5,724354	1,31E-05	Pheromone receptor-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-82	XP_003591203.1
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene19344	2,665084	1,90E-05	Cytochrome P450	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB52689.1
gene19348	2,023278	1,85E-05	cytochrome P450 family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002320071.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene27145	2,515842	8,90E-06	Secologanin synthase	<i>Morus notabilis</i>	5,00E-95	EXB52089.1
gene20995	2,310759	9,69E-06	strictosidine synthase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002323255.1
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>						
gene08838	3,140523	4,38E-05	AP2 domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	6,00E-81	ADE41137.1
gene19880	8,215818	7,21E-06	bHLH family transcriptional factor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-24	NP_001118345.1
gene30478	7,481813	2,97E-07	helix-loop-helix domain-containing protein (FaPRE1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-20	NM_179381.2
gene11073	2,277039	4,76E-06	MADS box transcription factor (MADS3)	<i>Ipomoea batatas</i>	5,00E-08	AF345246.1
gene21000	2,035259	2,48E-05	Transcription factor bHLH51	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-92	XP_003600927.1
gene07418	2,339813	2,44E-06	Transcription factor TT2	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-72	EXC17473.1
gene25171	2,122908	5,99E-05	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 16	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-114	EXB56925.1
<b>TRANSPORTER ACTIVITY</b>						
gene19623	2,037466	4,82E-06	ATPase, F1 complex, gamma subunit protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007026083.1
gene00122	2,146828	3,28E-05	ATP-binding cassette transport family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XM_006383944
gene31003	4,540713	3,99E-07	Dynein light chain	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-56	XP_003609287.1
gene03860	3,346285	6,28E-05	lysine and histidine specific transporter family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002315954.2
gene03854	3,291389	1,31E-05	lysine and histidine specific transporter family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	9,00E-110	XP_002315954.2
gene08551	2,445006	5,75E-05	multidrug resistance P-glycoprotein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002301961.1
gene09340	2,206386	4,70E-05	potassium channel	<i>Malus hupehensis</i>	0,00E+00	AEY75250.1
gene04156	2,191931	6,34E-05	vacuolar iron transporter 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-107	NP_178286.1
<b>MISCELLANEOUS</b>						
gene31112	2,727032	3,59E-05	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-35	NP_565348.1
gene29295	2,709976	6,24E-05	DUF2996 family protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-59	KEH18726.1
gene13917	6,786288	4,05E-08	DVL protein	<i>Cleome spinosa</i>	1,00E-07	ABD96875.1
gene31048	4,102876	1,99E-07	EPIDERMAL PATTERNING FACTOR	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-24	XM_003609297.1
gene32401	2,252854	4,07E-05	Generative cell specific-1	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-15	XP_007040136.1
gene32403	2,035886	6,29E-05	HAP2	<i>Medicago truncatula</i>	7,00E-100	XP_003611139.1
gene27979	2,388507	6,16E-06	methyltransferase type 11	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-137	AES78531.2
gene19954	4,971120	2,56E-08	MOSC domain-containing protein 1, mitochondrial	<i>Vitis vinifera</i>	7,00E-134	XP_002273557.1
gene13176	2,329695	4,76E-06	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-119	XP_007038844.1
gene00893	3,266823	4,62E-07	pentatricopeptide repeat-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_196881.2
gene29669	2,089465	4,35E-05	plant/F28N24-12 protein	<i>Medicago truncatula</i>	9,00E-35	KEH36596.1
gene24128	2,605820	8,89E-06	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-31	NP_173124.2
gene03796	2,959668	3,32E-05	Pmr5/Cas1p GDSL/SGNH-like acyl-esterase family protein	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-151	KEH25275.1
gene10712	3,062002	1,32E-07	Protein LOL1	<i>Glycine max</i>	1,00E-66	XM_003549934.1
gene04104	2,318122	9,06E-06	senescence-associated protein	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,00E-43	AGV54243.1
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene17017	8,421145	7,53E-06	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	5,00E-121	XM_002272070.2
gene02077	4,221468	3,77E-06	Uncharacterized protein	<i>Populus trichocarpa</i>	8,00E-58	XM_002324936.1
gene32385	3,298082	2,04E-06	Uncharacterized protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-14	NM_001036055
gene12931	3,112354	1,98E-06	Uncharacterized protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-100	AY035083.1
gene18521	2,986100	2,36E-06	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	5,00E-53	XP_008369700.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>UP regulated</b>						
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene21836	2,708855	1,81E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	3,00E-32	XP_008236940.1
gene18189	2,648603	3,20E-05	Uncharacterized protein	<i>Fragaria × ananassa</i>	1,00E-144	DQ180308.1
gene26516	2,542457	6,79E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	5,00E-13	XP_008244666.1
gene01543	2,154229	3,06E-05	Uncharacterized protein	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-78	EXB28742.1
gene33389	2,086226	6,34E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	7,00E-11	XP_007222144.1
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene14935	10,572757	5,05E-07	No homology			
gene32312	9,275409	5,09E-07	No homology			
gene10331	6,790582	1,31E-05	No homology			
gene29348	6,279904	4,95E-09	No homology			
gene25652	5,320043	8,85E-07	No homology			
gene06287	3,840298	6,26E-06	No homology			
gene12924	3,775173	6,37E-05	No homology			
gene06708	3,126222	4,84E-06	No homology			
gene03226	3,111322	2,14E-06	No homology			
gene04295	2,980429	3,21E-07	No homology			
gene04243	2,779246	2,81E-05	No homology			
gene10192	2,717994	2,29E-05	No homology			
gene09849	2,206189	2,34E-05	No homology			
<b>DOWN regulated</b>						
<b>ABIOTIC STRESS</b>						
gene21941	-5,331451	1,29E-06	early responsive to dehydration protein 15	<i>Ipomoea batatas</i>	1,00E-45	AHC94919.1
gene15418	-6,396247	3,67E-05	heat shock protein 17.7	<i>Populus trichocarpa</i>	3,00E-81	XP_002308537.1
gene21597	-2,061536	1,72E-05	Heat shock protein 89.1 isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007049300.1
gene15872	-6,842531	5,57E-07	heat stress transcription factor	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	NP_001281032.1
gene31857	-7,161761	5,94E-05	Late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycofamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-53	XP_007040367.1
gene31974	-3,667312	2,42E-05	Late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycofamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	7,00E-46	XP_007040367.1
gene32536	-9,847593	4,92E-05	late embryogenesis abundant protein	<i>Tamarix hispida</i>	4,00E-127	AHF21578.1
gene12687	-12,867977	4,30E-06	salt responsive protein 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,00E+00	NP_001234228.1
gene25213	-4,128254	1,54E-06	Zinc finger AN1 and C2H2 domain-containing stress-associated protein 16	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-151	EXB93618.1
<b>AMINO ACID METABOLISM</b>						
gene19242	-2,889439	4,09E-06	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-127	NM_128618.3
gene13440	-10,079635	5,47E-08	tryptophan synthase alpha chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-135	NP_192170.1
<b>BIOTIC STRESS/PLANT DEFENSE</b>						
gene32054	-2,664174	2,49E-06	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 194	<i>Nicotiana tabacum</i>	1,00E-39	AAG43553.1
gene24127	-4,643016	1,59E-07	disease resistance protein	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	1,00E-122	AEN71144.1
gene24126	-3,224353	1,36E-05	disease resistance protein	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	1,00E-160	

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>BIOTIC STRESS/PLANT DEFENSE</b>						
gene24122	-5,175817	2,88E-07	Disease resistance protein ADR1	<i>Ricinus communis</i>	4,00E-48	XM_002522285.1
gene05122	-3,563551	3,81E-05	Fra a 2 allergen	<i>Fragaria × ananassa</i>	2,00E-107	ACX47057.1
gene12345	-2,660655	1,71E-05	MAC/Perforin domain-containing protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007049981.1
gene04189	-17,455251	4,05E-09	Natterin-4	<i>Triticum urartu</i>	2,00E-46	EMS59040.1
gene04191	-12,967276	8,04E-10	Natterin-4	<i>Triticum urartu</i>	7,00E-42	EMS59040.1
gene29372	-2,861942	2,23E-05	NB-ARC domain-containing protein	<i>Malus domestica</i>	3,00E-134	ACG70794.1
gene00477	-5,248728	6,84E-05	NDR1/HIN1-LIKE 25 family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	6,00E-91	XP_002318799.2
gene09065	-6,304886	5,43E-06	Patatin group A-3	<i>Morus notabilis</i>	3,00E-45	EXB86649.1
gene16110	-4,480140	3,63E-06	phytoalexin-deficient 4-1 protein	<i>Solanum tuberosum</i>	3,00E-138	AY753546.1
gene03179	-3,203909	8,91E-06	protein NDR1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-51	NP_188696.1
gene30624	-6,461930	3,92E-06	Protein TIFY 5A	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-22	EXC29332.1
gene24321	-3,692498	4,01E-07	Protein TIFY 5A	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-12	EXC29332.1
gene09356	-4,281095	9,34E-06	Protein TIFY 6B	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-111	
gene19782	-12,643407	1,35E-08	protein TIFY 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,00E-18	NP_568287.1
gene16020	-3,836830	3,79E-05	resistance gene analog NBS5	<i>Helianthus annuus</i>	2,00E-33	AAL07540.1
gene16017	-5,484309	5,52E-07	resistance gene analog NBS7	<i>Helianthus annuus</i>	1,00E-54	AAL07542.1
gene33984	-3,198893	6,26E-06	resistance protein	<i>Glycine max</i>	8,00E-68	ACM89629.1
gene16021	-3,829502	3,51E-06	RGH8	<i>Cucumis melo</i>	4,00E-93	AGH33846.1
gene34373	-3,171169	3,53E-05	TIR-NBS-LRR	<i>Rosa rugosa</i>	5,00E-44	AFP55548.1
gene34978	-6,391900	4,00E-07	TIR-NBS-LRR resistance protein muRdr1B	<i>Rosa multiflora</i>	5,00E-131	AEE43926.1
gene34613	-4,893566	7,83E-08	TIR-NBS-LRR type protein	<i>Fragaria × ananassa</i>	2,00E-30	ADZ44604.1
gene05795	-3,935749	3,51E-06	VQ motif-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-24	XP_002310889.2
<b>CELL DIVISION CYCLE</b>						
gene19291	-4,530123	2,49E-06	cyclic nucleotide-gated channel C family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-47	XP_002317760.1
gene13092	-3,305379	2,18E-06	cyclic nucleotide-gated ion channel 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_200125.1
gene17638	-3,280492	1,16E-06	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>Morus notabilis</i>	5,00E-59	EXC24197.1
gene22382	-5,690232	1,93E-07	cyclin-related family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002322714.1
gene10268	-2,796096	1,98E-05	HIT-type Zinc finger family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-36	NM_001197981.1
gene23936	-2,534052	5,60E-06	septum-promoting GTP-binding protein 1-like	<i>Glycine max</i>	1,00E-93	XM_003539821.1
<b>CELL ELONGATION</b>						
gene21137	-2,123707	3,66E-05	BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYLS 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,00E-35	NP_191890.1
gene29570	-3,070303	7,67E-06	ovate family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	3,00E-81	XP_002310801.1
<b>CELL WALL</b>						
gene11966	-4,759847	1,58E-05	Annexin 5 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-140	XP_007037002.1
gene28696	-8,486672	5,47E-08	brassinosteroid-regulated protein BRU1-like precursor	<i>Malus domestica</i>	1,00E-161	NP_001281066.1
gene13721	-3,435821	4,35E-05	Cellulose synthase-like protein D3	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB29156.1
gene26607	-4,573316	2,20E-08	endo-1,3-beta-glucanase	<i>Pyrus pyrifolia</i>	0,00E+00	ACM45718.1
gene17381	-3,839274	3,10E-06	Galacturonosyltransferase 8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_189150.1
gene14081	-7,076509	6,98E-07	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC10654.1
gene30784	-9,401771	2,20E-08	Glucuronidase 3 isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007013614.1
gene07504	-6,398969	8,54E-08	hydroxyproline-rich glycoprotein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-23	XP_006369280.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>CELL WALL</b>						
gene05463	-3,259001	9,85E-06	pectin methylesterase (ATPME2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	U25649.1
gene12964	-2,736819	4,33E-05	Pectinesterase	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007012506.1
gene29850	-4,586421	5,42E-06	UDP-glucuronate 4-epimerase 1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB94890.1
gene04109	-2,436090	1,98E-06	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl- pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase isoform 3	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-100	XP_007036248.1
gene05205	-13,086907	1,36E-09	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	<i>Rosa hybrid</i>	1,00E-54	BAH36875.1
gene32171	-12,817032	4,13E-05	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	<i>Rosa hybrida</i>	3,00E-171	AB428380.1
gene19783	-5,424896	6,73E-06	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-149	XP_007014165.1
gene12291	-5,531608	3,18E-05	xyloglucan endotransglycosylase 2	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	2,00E-165	AGR44475.1
gene02631	-5,067900	2,34E-08	Xyloglucan glycosyltransferase 12	<i>Glycine max</i>	0,00E+00	XM_003544452.1
<b>DNA/RNA METABOLISM</b>						
gene13122	-2,331695	3,78E-06	HAT transposon superfamily isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007038931.1
gene24333	-7,306085	1,95E-05	mutator-like transposase	<i>Rosa rugosa</i>	5,00E-17	AFP55551.1
gene15986	-2,571148	4,85E-06	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-67	XP_007015724.1
gene02536	-2,929008	8,21E-07	pumilio homolog protein	<i>Vitis vinifera</i>	9,00E-106	XM_003634384.1
gene03117	-2,558129	3,50E-05	RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like protein 4	<i>Aegilops tauschii</i>	1,00E-54	EMT13574.1
gene01501	-12,852079	4,86E-09	serine-rich family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-14	XP_002298885.1
gene11628	-5,057043	5,53E-07	SYNC1 protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-105	XP_003603391.1
gene01540	-2,227398	5,73E-05	transcriptional regulator of RNA polIII, SAGA, subunit	<i>Medicago truncatula</i>	7,00E-76	KEH44031.1
<b>HORMONES</b>						
gene08258	-4,751242	5,13E-06	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-1-like protein	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-113	EXC31932.1
gene31839	-10,144414	9,83E-08	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	<i>Eriobotrya japonica</i>	0,00E+00	ACT54524.2
gene10931	-7,027854	5,73E-05	abscisic acid 8'-hydroxylase 1-like	<i>Citrus sinensis</i>	0,00E+00	NP_001275876.1
gene12485	-9,338274	2,28E-05	Auxin-binding protein ABP19a	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-98	EXB38936.1
gene13969	-3,833128	2,31E-05	auxin-regulated protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-127	KEH30111.1
gene29735	-2,794249	2,79E-05	Ethylene responsive transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-55	XP_003593626.1
gene10841	-4,934169	9,62E-06	ethylene responsive transcription factor 1a	<i>Prunus salicina</i>	2,00E-79	ACM49849.1
gene04911	-7,902744	2,40E-09	Ethylene responsive transcription factor 13	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-39	EXB37644.1
gene15316	-5,201774	2,61E-07	HVA22-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	9,00E-69	XM_003635810.1
gene00715	-6,594050	2,40E-09	iaa-amino acid hydrolase 10	<i>Populus trichocarpa</i>	6,00E-145	XM_002311832
gene05383	-9,816620	7,29E-07	jasmonate ZIM-domain protein 3	<i>Nicotiana tabacum</i>	5,00E-27	BAG68657.1
gene03935	-4,621998	5,89E-05	SAUR family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-60	XM_002320012.1
gene26559	-4,077396	5,17E-07	TB2/DPI1, HVA22 family protein	<i>Medicago truncatula</i>	6,00E-23	KEH31927.1
<b>KINASES</b>						
gene03996	-3,334002	1,75E-05	Kinase 2B isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007046178.1
gene28630	-6,711461	8,72E-06	kinase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	3,00E-164	XP_002313524.2
gene18005	-2,397295	3,37E-06	Kinase superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007029038.1
gene17121	-2,245760	6,72E-06	lectin-like protein kinase	<i>Populus nigra</i>	0,00E+00	AB030083.1
gene27472	-7,882011	2,49E-06	Leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-165	EXB57397.1
gene09467	-3,855823	9,41E-07	Leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB57397.1
gene05695	-8,655558	1,61E-07	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002311912.2

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>KINASES</b>						
gene05696	-8,426351	2,00E-07	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002310940.2
gene30035	-4,193381	4,49E-05	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-88	XP_007022387.1
gene04272	-2,417823	1,05E-05	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB38107.1
gene13789	-2,065838	3,07E-05	LRR-kinase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002309159.2
gene17719	-2,724490	2,18E-05	L-type lectin-domain containing receptor kinase VII.1	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-180	EXC18105.1
gene29329	-5,968634	2,64E-05	LysM type receptor kinase	<i>Lotus japonicus</i>	0,00E+00	BAI79278.1
gene09932	-3,515769	2,77E-05	Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-51	XP_007036379.1
gene31446	-6,420968	3,69E-06	Plant-specific domain TIGR01570 family protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-89	XP_003602481.1
gene10502	-8,182846	6,22E-07	pollen-specific small CDPK-interacting protein 1	<i>Petunia integrifolia subsp. inflata</i>	1,00E-10	AGH62538.1
<b>LIPID METABOLISM</b>						
gene30963	-5,227208	5,98E-06	3-ketoacyl-CoA synthase	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007013326.1
gene10328	-5,422760	2,34E-08	Allene oxide cyclase (AOC)	<i>Camellia sinensis</i>	1,00E-87	HQ889679.1
gene15063	-2,950810	2,00E-05	Allene oxide synthase protein	<i>Lonicera japonica</i>	0,00E+00	DQ303120.1
gene11750	-2,661333	2,92E-06	Elongation of fatty acids protein 1	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-63	EXB97331.1
gene32121	-3,675023	8,54E-08	GDSL esterase/lipase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB97806.1
gene05424	-10,494357	2,11E-07	GDSL-motif lipase 2	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-113	XP_007024742.1
gene15082	-4,060817	3,29E-07	GNS1/SUR4 membrane protein family	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-99	XP_007017452.1
gene02400	-2,499448	6,08E-05	long-chain fatty acyl CoA ligase	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-17	KEH40770.1
gene20986	-5,067037	1,76E-06	Omega-3 desaturase	<i>Malus x domestica</i>	0,00E+00	AY551558.1
gene15739	-2,410838	6,76E-05	Phosphatidic acid phosphatase-related protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-113	XP_007023211.1
gene01865	-3,413000	1,14E-05	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007039336.1
gene24691	-7,016515	3,30E-08	Squalene epoxidase 1	<i>Nigella sativa</i>	0,00E+00	FJ232947.1
gene24700	-3,649309	2,29E-06	squalene epoxidase 1	<i>Eriobotrya japonica</i>	0,00E+00	AFI33133.2
<b>PHOTOSYNTHESIS</b>						
gene13675	-2,671082	1,71E-06	plastidial glycolate/glycerate translocator 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NP_564388.1
<b>PRIMARY METABOLISM</b>						
gene13441	-5,899731	1,61E-07	Aldolase-type TIM barrel family protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-133	XP_007050430.1
gene05019	-2,390599	5,77E-06	alkaline/neutral invertase CINV2	<i>Malus domestica</i>	0,00E+00	NP_001281053.1
gene12990	-4,191189	4,62E-05	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007033091.1
gene32030	-11,455868	2,18E-06	Early nodulin-like protein 1	<i>Morus notabilis</i>	3,00E-28	EXC02951.1
gene12063	-5,184171	6,80E-06	Folic acid and derivative biosynthetic process	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-120	XP_007018157.1
gene09003	-2,038139	5,13E-06	NADP-dependent malic enzyme	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,00E+00	J03825.1
<b>PROTEIN METABOLISM</b>						
gene17530	-2,780230	9,82E-06	60S ribosomal protein	<i>Hevea brasiliensis</i>	2,00E-76	HM363483
gene04442	-2,986684	1,32E-07	60S ribosomal protein L34	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-85	AES74719.2
gene10366	-4,867378	8,58E-06	Ankyrin repeat family protein	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-93	XP_007030512.1
gene13049	-8,786244	2,34E-08	Ankyrin repeat-containing protein	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-115	EXB66197.1
gene13048	-3,590415	1,24E-05	Ankyrin repeat-containing protein	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-116	EXB66197.1
gene13050	-6,387007	7,20E-09	Ankyrin repeat-containing-like protein	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-39	XP_007009599.1
gene31557	-3,173237	5,67E-05	chaperone protein DnaJ-like	<i>Glycine max</i>	9,00E-69	XM_003521623.1
gene08455	-8,142063	1,75E-05	F-box family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-105	XP_006384770.1

(Table continues on following page)



Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>PROTEIN METABOLISM</b>						
gene09781	-18,627360	3,63E-10	F-box protein	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-19	EXC20948.1
gene05951	-10,417203	9,57E-09	F-box protein	<i>Morus notabilis</i>	5,00E-27	EXC20948.1
gene03336	-4,912901	1,32E-07	F-box protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-72	NM_118324.1
gene31438	-3,237352	8,56E-07	F-box protein interaction domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	7,00E-34	AES64334.2
gene18307	-5,870268	2,42E-05	Plant U-box 23	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007027990.1
gene07511	-2,550957	6,04E-05	Puromycin-sensitive aminopeptidase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB88333.1
gene18503	-6,929010	3,19E-06	SKP1-interacting partner 15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,00E+00	NM_106343.3
gene18505	-5,757729	5,52E-06	SKP1-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-08	XM_003616811.1
gene22977	-4,771266	3,52E-05	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (BTB/POZ and MATH domain-containing protein)	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-61	XP_003609855.1
<b>RECEPTORS</b>						
gene16866	-3,138023	1,08E-06	Heptahelical transmembrane protein2	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-149	XP_007013901.1
gene04332	-2,788094	6,44E-05	Heptahelical transmembrane protein2	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-13	XP_007013901.1
gene30550	-2,260017	3,30E-05	flagelling sensing 2	<i>Vitis vinifera</i>	0,00E+00	AHC08662.1
gene30625	-10,783740	4,39E-06	Leucine-rich repeat (LRR) family protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-49	XP_007016687.1
gene09010	-3,150773	5,20E-05	leucine-rich repeat family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002324752.1
<b>REDOX RELATED PROTEIN</b>						
gene12885	-4,332770	2,28E-05	2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-135	XP_007035072.1
gene00164	-2,292430	3,86E-06	5'-adenylsulfate reductase 1	<i>Morus notabilis</i>	9,00E-19	EXB55121.1
gene21247	-3,792860	1,64E-07	Monocopper oxidase-like protein SKS1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC08927.1
gene06775	-4,686113	5,18E-06	Monothiol glutaredoxin-S2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-50	NM_121865.3
gene06754	-3,844823	6,46E-05	Monothiol glutaredoxin-S2	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-46	EXB74836.1
gene00215	-6,528832	5,36E-06	NADPH oxidase	<i>Fragaria × ananassa</i>	0,00E+00	AGI65628.1
gene17026	-2,600783	3,92E-05	Peroxidase 16 precursor family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	4,00E-161	XM_002324427.2
<b>SECONDARY METABOLISM</b>						
gene17369	-8,897805	1,30E-05	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1	<i>Pyrus pyrifolia</i>	0,00E+00	ACE80213.1
gene17371	-8,716251	2,29E-05	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1	<i>Pyrus pyrifolia</i>	0,00E+00	ACE80213.1
gene15010	-8,974486	2,31E-07	Chorismate mutase	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-90	EXB86679.1
gene22067	-7,464556	2,35E-06	Cytochrome P450	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XM_003606175.1
gene13258	-5,404963	3,24E-06	Cytochrome P450	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XP_003592277.1
gene13259	-4,804101	7,14E-07	Cytochrome P450	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	XP_003592277.1
gene25884	-5,074826	5,75E-05	Cytochrome P450 94A1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC33355.1
gene12513	-2,631828	1,84E-05	Cytochrome P450 superfamily protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007012628.1
gene24667	-16,532477	2,95E-06	farnesene synthase	<i>Prunus cerasoides var. campanulata</i>	0,00E+00	AIC76499.1
gene19171	-5,893141	8,41E-06	Lachrymatory-factor synthase	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-45	XM_003603590.1
gene18341	-2,328894	1,39E-05	Leucoanthocyanidin dioxygenase	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB99433.1
gene30947	-3,462060	4,38E-05	UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase	<i>Rosa hybrid</i>	0,00E+00	BAE72453.1
gene29526	-2,803313	2,38E-05	UTP-glucose glucosyltransferase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002310202.1
<b>SIGNALING</b>						
gene25026	-5,833943	1,48E-05	Calcium-binding EF-hand family protein	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-52	XP_007021183.1
gene01969	-4,924577	7,67E-06	calcium-binding EF-hand protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-47	AES67313.2
gene02710	-9,200906	2,40E-09	calmodulin-binding family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002324731.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>SIGNALING</b>						
gene12671	-5,184984	6,67E-05	Calmodulin-binding family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007012786.1
gene31558	-7,117658	2,26E-05	calmodulin-binding protein 60-C	<i>Populus trichocarpa</i>	2,00E-151	XP_006382422.1
gene01967	-5,772201	2,80E-06	Calcium-binding protein PBPI	<i>Vitis vinifera</i>	2,00E-53	XM_002281842.2
gene19615	-4,285187	5,75E-05	Calcium-dependent protein kinase 21 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007026066.1
gene03603	-9,142924	1,97E-06	Cysteine-rich RLK 3 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007044718.1
gene26922	-2,339431	4,32E-05	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase family protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-138	XP_007018385.1
gene19060	-5,469476	7,31E-06	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein 1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC06842.1
gene23278	-3,117237	1,39E-05	Pleckstrin (PH) and lipid-binding START domains-containing protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007009855.1
gene14252	-7,010947	2,55E-05	pleckstrin-like (PH) and lipid-binding START domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	KEH32165.1
gene08590	-2,735501	3,92E-05	Phospholipase D isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007017919.1
gene24105	-2,699303	1,12E-05	Serine/threonine protein kinase BIK1	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-72	XP_003629128.1
gene20972	-2,701469	1,12E-06	serine/threonine-protein kinase	<i>Acacia mangium</i>	0,00E+00	BAO45865.1
gene19907	-4,132684	7,06E-05	Serine/threonine-protein kinase bri1	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-113	XP_007031844.1
gene27940	-2,512411	6,14E-05	Serine/threonine-protein kinase HT1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC20355.1
gene17422	-3,932464	1,97E-06	serine/threonine-protein kinase OXII (AGC2-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-117	NM_113431.5
gene15162	-2,749825	2,78E-05	Tubby like protein 6	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-96	XP_007017568.1
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>						
gene04913	-8,634238	1,35E-08	AP2 domain class transcription factor	<i>Malus x domestica</i>	8,00E-44	GU732455.1
gene13327	-4,251076	4,44E-06	AP2 domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	2,00E-48	ADE41109.1
gene00975	-3,503634	8,69E-06	AP2 domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	2,00E-25	ADE41150.1
gene21166	-6,034206	1,45E-06	AP2 domain class transcription factor	<i>Malus x domestica</i>	1,00E-52	GU732483
gene17273	-16,111765	9,52E-06	Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-130	XP_007014436.1
gene09735	-6,548987	2,18E-05	BHLH domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	4,00E-34	ADL36595.1
gene29575	-3,930591	5,51E-05	BHLH domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	1,00E-27	ADL36595.1
gene10501	-7,558458	1,61E-06	BHLH domain class transcription factor (BHLH2)	<i>Malus x domestica</i>	0,00E+00	HM122456
gene07265	-12,693339	2,19E-07	bHLH transcription factor	<i>Gossypium hirsutum</i>	9,00E-42	AHA11095.1
gene32515	-8,228201	2,12E-06	BTB/POZ domain-containing protein	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB37331.1
gene30252	-2,638620	1,42E-05	bZIP transcription factor family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-104	XP_006381298.1
gene18205	-2,390412	3,43E-05	C2H2 type zinc finger transcription factor family protein	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-52	KEH42343.1
gene22045	-3,149729	1,02E-05	C2H2L domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	4,00E-57	ADL36641.1
gene03285	-3,992358	1,02E-05	GRAS family transcription factor isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007021110.1
gene08084	-4,816382	1,32E-06	GmMYB29 family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	7,00E-91	XP_002302045.1
gene09039	-8,970901	2,29E-06	MYB transcription factor MYB124	<i>Glycine max</i>	3,00E-83	NP_001235925.1
gene01998	-17,933667	1,10E-05	myb-related protein Myb4-like	<i>Malus domestica</i>	5,00E-83	NP_001280912.1
gene17203	-6,534940	6,50E-06	NAC domain protein NAC20	<i>Gossypium hirsutum</i>	1,00E-118	AHJ79161.1
gene21755	-2,917020	4,21E-06	NAC transcription factor	<i>Nicotiana tabacum</i>	5,00E-17	ACF19787.1
gene31123	-9,682427	3,41E-08	Transcription elongation factor SPT6	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-56	EXC30727.1
gene17723	-8,898064	1,70E-05	Transcription factor bHLH36	<i>Medicago truncatula</i>	9,00E-60	XP_003607469.1
gene12308	-7,120526	7,69E-07	WRKY domain class transcription factor	<i>Malus domestica</i>	6,00E-111	ADL36859.1
gene28720	-2,402247	6,85E-05	WRKY transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>	5,00E-62	XM_003617375.1
gene13803	-8,516519	3,02E-05	WRKY transcription factor 08	<i>Jatropha curcas</i>	4,00E-161	AGJ52154.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>TRANSCRIPTION FACTORS</b>						
gene19019	-2,765256	4,05E-07	WRKY transcription factor 22	<i>Morus notabilis</i>	3,00E-87	EXB51621.1
gene13108	-4,526829	4,22E-06	WRKY transcription factor 27	<i>(Populus tomentosa x P. bolleana) x P. tomentosa</i>	3,00E-98	ACV92029.1
gene15013	-13,195086	5,28E-05	WRKY transcription factor 29	<i>Jatropha curcas</i>	5,00E-56	AGQ04217.1
gene02102	-5,704464	1,13E-06	WRKY transcription factor 40a	<i>Malus hupehensis</i>	7,00E-148	AGG23550.1
gene19219	-4,478206	2,05E-05	WRKY transcription factor 46	<i>Malus hupehensis</i>	2,00E-119	AGG23552.1
gene32076	-4,982244	2,29E-06	WRKY transcription factor 53	<i>Vitis vinifera</i>	2,00E-62	XM_002267757.2
gene13547	-4,128158	6,49E-05	WRKY transcription factor 56	<i>Jatropha curcas</i>	4,00E-62	AGQ04250.1
<b>TRANSPORTER ACTIVITY</b>						
gene04460	-2,912355	5,13E-06	amino acid transporter	<i>Populus trichocarpa</i>	7,00E-171	XM_002323825.1
gene28000	-5,110421	2,80E-06	amino acid transporter family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	7,00E-173	XM_002311042
gene19727	-2,645196	1,43E-05	Autoinhibited calcium ATPase	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-91	XP_007034901.1
gene08748	-4,143134	3,06E-05	Cation transport regulator 2	<i>Vitis vinifera</i>	3,00E-116	XM_002283167.1
gene19287	-5,445250	5,61E-06	CNGC5-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-60	XP_003610314.1
gene01180	-8,286524	1,96E-07	Coiled-coil domain-containing protein 109A isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	5,00E-119	XP_007017121.1
gene00323	-6,658709	1,91E-06	Dynein light chain	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-42	EXB51370.1
gene25868	-2,036284	4,97E-05	Mitochondrial import receptor subunit TOM20	<i>Morus notabilis</i>	3,00E-61	EXC35682.1
gene02711	-3,973418	3,29E-07	Mitochondrial substrate carrier family protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	7,00E-173	XP_007012315.1
gene25387	-2,531824	1,08E-05	Nitrate excretion transporter 1	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC33223.1
gene04037	-3,624917	2,26E-05	nitrate transporter 1.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-178	NP_564979.1
gene23533	-3,572834	2,33E-06	outward-rectifying potassium channel KCO1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	1,00E-157	AAF97863.1
gene32199	-2,099467	3,28E-05	Phosphoenolpyruvate/phosphate translocator 1	<i>Morus notabilis</i>	4,00E-175	EXB29620.1
gene30887	-3,131263	1,24E-05	Polyol/monosaccharide transporter 5 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-108	XP_007013174.1
gene32443	-5,551019	2,90E-06	Protein LURP-one-related 11	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-63	EXB37382.1
gene32444	-3,018276	6,73E-06	Protein LURP-one-related 11	<i>Morus notabilis</i>	1,00E-83	EXB37382.1
gene13819	-5,247002	1,39E-06	protein LURP-one-related 15	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,00E-71	AGV54542.1
gene19795	-2,074491	5,97E-05	Rab GTP-binding protein Rab11a	<i>Gossypium hirsutum</i>	2,00E-139	AAD48018.1
gene21825	-3,813263	9,83E-06	Sec14 cytosolic factor	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXC04414.1
gene01868	-6,471390	4,49E-05	solute carrier family 35 member F1-like	<i>Vitis vinifera</i>	5,00E-179	XM_002271889
gene15130	-4,573689	3,87E-06	Sugar transporter	<i>Theobroma cacao</i>	2,00E-47	XP_007017505.1
<b>MISCELLANEOUS</b>						
gene03763	-2,749504	1,70E-05	agenet domain-containing family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002312391.2
gene20964	-5,201156	6,33E-08	Alpha/beta hydrolase related protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-86	XP_007009003.1
gene30400	-7,584834	2,56E-06	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007024951.1
gene00792	-6,539658	8,10E-06	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	3,00E-147	XP_007043228.1
gene08196	-4,430447	6,43E-06	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007050417.1
gene11881	-2,420130	1,62E-05	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007013072.1
gene15841	-5,697815	1,15E-05	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007033998.1
gene26706	-4,425238	3,88E-06	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-170	XP_007043228.1
gene02568	-6,310768	2,11E-07	ARM repeat superfamily protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007018507.1
gene29064	-6,028853	2,59E-05	ARM repeat superfamily protein isoform 2	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007034928.1

(Table continues on following page)

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>MISCELLANEOUS</b>						
gene18816	-3,997109	3,10E-05	BAHD acyltransferase DCR	<i>Morus notabilis</i>	0,00E+00	EXB89937.1
gene05816	-2,526267	9,30E-07	Blue copper protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-51	XP_003592422.1
gene04676	-3,311333	3,87E-05	DUF1336 family protein	<i>Medicago truncatula</i>	0,00E+00	KEH27840.1
gene15035	-4,600976	2,76E-06	DUF868 family protein	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-66	KEH39864.1
gene03863	-3,027383	3,77E-06	Endosomal targeting BRO1-like domain-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,00E-78	NP_563927.3
gene12838	-3,706996	1,31E-06	hydrolase, alpha/beta fold family protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	7,00E-148	XP_002865953.1
gene12529	-3,019293	1,99E-07	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain-related family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	0,00E+00	XP_002324729.2
gene31919	-31,977693	1,85E-09	major latex protein	<i>Morus notabilis</i>	8,00E-56	EXB52998.1
gene14120	-6,723944	5,36E-06	mannose-binding lectin superfamily protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-28	KEH34301.1
gene13800	-5,755199	1,29E-05	Methyltransferases	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007026550.1
gene03914	-4,773599	2,95E-06	nitroreductase family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-110	NM_100082
gene11954	-10,025524	4,38E-05	Phosphate-responsive 1 family protein	<i>Theobroma cacao</i>	4,00E-151	XP_007018741.1
gene11953	-8,569940	1,43E-05	Phosphate-responsive 1 family protein	<i>Theobroma cacao</i>	6,00E-168	XP_007018741.1
gene11952	-7,720037	3,99E-05	Phosphate-responsive 1 family protein	<i>Theobroma cacao</i>	8,00E-157	XP_007018741.1
gene21295	-3,341810	3,73E-08	PLAC8 family protein	<i>Theobroma cacao</i>	0,00E+00	XP_007008828.1
gene08279	-3,167879	1,15E-05	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-115	NP_194585.1
gene05455	-6,320004	4,65E-06	senescence-associated family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	6,00E-10	XP_002314376.2
gene25938	-9,329256	9,57E-09	Sex determination protein tasselseed-2	<i>Morus notabilis</i>	7,00E-103	EXC34228.1
gene34438	-6,632948	1,96E-07	T2.14	<i>Malus x robusta</i>	1,00E-34	CCH50993.1
gene34440	-6,339399	5,37E-08	T2.14	<i>Malus robusta</i>	9,00E-36	CCH50993.1
gene34441	-7,618170	3,41E-08	T2.14	<i>Malus x robusta</i>	2,00E-36	CCH50993.1
gene12731	-4,256736	6,85E-07	Thermospermine synthase ACAULIS5	<i>Morus notabilis</i>	2,00E-162	EXB38919.1
gene20336	-6,432837	4,05E-08	Transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein 4	<i>Zea mays</i>	2,00E-63	NM_001156335.1
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene27107	-13,928523	1,85E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	7,00E-32	XP_007203279.1
gene00610	-13,407341	3,72E-09	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	3,00E-14	XP_007201405.1
gene16025	-10,751606	1,13E-06	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	5,00E-17	XP_008361338.1
gene15067	-10,093637	1,31E-08	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	8,00E-148	XP_007226645.1
gene19125	-10,086622	5,85E-05	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	5,00E-66	XM_003635171.1
gene03663	-9,979755	2,53E-05	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	4,00E-46	XP_008340278.1
gene24117	-9,450580	1,29E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	0,00E+00	XP_008241548.1
gene14158	-9,176517	2,80E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	3,00E-25	XP_008223163.1
gene31862	-7,425369	2,11E-07	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	2,00E-94	XP_008345127.1
gene18243	-6,164407	3,52E-05	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	1,00E-48	XP_008387144.1
gene33108	-5,965540	3,02E-05	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	8,00E-29	XP_008342691.1
gene02329	-5,438262	1,88E-05	Uncharacterized protein	<i>Theobroma cacao</i>	1,00E-44	XP_007051060.1
gene14366	-4,813362	9,24E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	4,00E-15	XP_007203440.1
gene07007	-4,607897	2,08E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	6,00E-43	XP_007223508.1
gene28064	-4,514898	6,33E-07	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	1,00E-76	XP_008245027.1
gene26542	-4,458586	6,63E-07	Uncharacterized protein	<i>Citrus clementina</i>	2,00E-19	XP_006430488.1
gene00210	-4,007309	1,54E-05	Uncharacterized protein	<i>Populus trichocarpa</i>	1,00E-80	XM_002299327.1

(Table continues on following page)

ADDITIONAL FILES

Gene ID	OX-FaPRE1 (fold change)	p-value	Annotation	Specie	e-value	Accession
<b>DOWN regulated</b>						
<b>UNCHARACTERIZED</b>						
gene01317	-3,761915	1,16E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	0,00E+00	XP_008230694.1
gene30467	-3,553639	1,15E-06	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	1,00E-16	XM_003635159.1
gene09387	-3,456066	4,30E-07	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	7,00E-163	XM_002278412.1
gene16333	-3,415290	1,31E-06	Uncharacterized protein	<i>Populus trichocarpa</i>	4,00E-108	XM_002307056.1
gene01275	-3,264528	2,36E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	1,00E-38	XP_008230722.1
gene16159	-3,225862	3,13E-05	Uncharacterized protein	<i>Malus domestica</i>	7,00E-21	XP_008352637.1
gene03723	-3,069627	3,39E-06	Uncharacterized protein	<i>Lotus japonicus</i>	4,00E-23	BT145208.1
gene07870	-2,791427	3,48E-06	Uncharacterized protein	<i>Vitis vinifera</i>	3,00E-167	XM_002279750.2
gene01274	-2,727566	6,11E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	8,00E-39	XP_008230722.1
gene02352	-2,701201	1,53E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	7,00E-25	XP_008226242.1
gene08333	-2,288197	3,19E-05	Uncharacterized protein	<i>Glycine max</i>	3,00E-56	XM_003521264.1
gene19753	-2,219599	7,02E-06	Uncharacterized protein	<i>Prunus mume</i>	9,00E-77	XP_008227495.1
gene10567	-2,847411	2,47E-05	Uncharacterized protein	<i>Prunus persica</i>	0,00E+00	XP_004292648.1
<b>NO HOMOLOGY</b>						
gene30760	-13,498317	1,39E-05	No homology			
gene33356	-9,590052	9,58E-10	No homology			
gene25414	-8,018007	3,36E-05	No homology			
gene09725	-6,808638	1,76E-07	No homology			
gene00311	-6,073700	3,73E-08	No homology			
gene22982	-5,741041	1,32E-07	No homology			
gene29367	-5,626586	4,02E-06	No homology			
gene20835	-5,599831	8,84E-06	No homology			
gene01388	-5,159403	6,42E-07	No homology			
gene12103	-5,087780	8,91E-06	No homology			
gene26306	-4,417372	9,05E-08	No homology			
gene01869	-4,178451	1,39E-06	No homology			
gene16914	-4,073086	1,14E-06	No homology			
gene34397	-2,738408	1,44E-05	No homology			
gene34206	-2,416487	2,38E-05	No homology			
gene23972	-2,356931	6,29E-05	No homology			
gene23684	-2,086839	5,75E-05	No homology			
gene01387	-2,067578	1,50E-05	No homology			
gene23250	-2,058026	5,69E-05	No homology			

**Additional table 5.**

**Total Microarray Data from Transcriptomic Comparison Between Transgenic Stably-Overexpressing FaPRE1 Fruits and No-Transgenics Control Fruits.** Gene ID and corresponding annotations as reported in *Fragaria vesca* Genome Database (<http://www.strawberrygenome.org/>) (Shulaev *et al.*, 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). Nature Genetics **43**, 109-116).

This file is available only on CD rom version

**Additional figure 2.**

Strawberry fruit receptacles at different development and maturation stages of the transgenic *Fragaria* × *ananassa* “Chandler” plants transformed with the pK7WG2-*FaPRE1* overexpressing *FaPRE1* (OX-*FaPRE1*) compared to control (WT).

