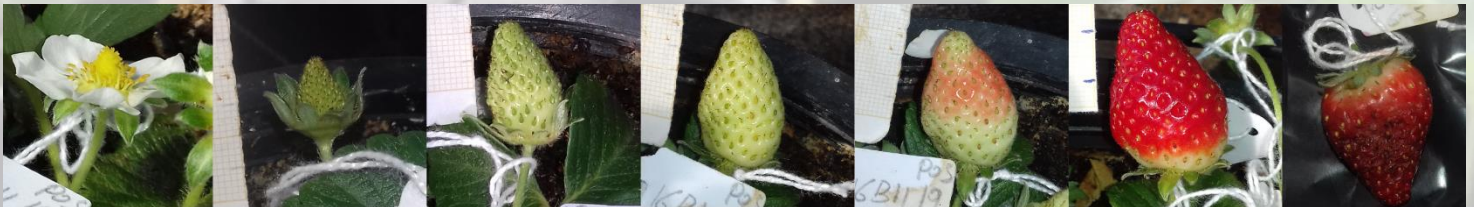




UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias, Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

**Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) ripening:  
Functional characterization of genes of  
biotechnological interest and cell culture  
validation as a model system for ripening  
research**



TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada

**Pablo Daniel Ric Varas**

2020


Directores: Dr. Antonio Javier Matas Arroyo

Dra. Enriqueta Moyano Cañete



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Pablo Daniel Ric Varas

 <http://orcid.org/0000-0002-8307-1650>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



# DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D. PABLO DANIEL RIC VARAS

Estudiante del programa de doctorado EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: STRAWBERRY (*FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.) RIPENING: FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF GENES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST AND CELL CULTURE VALIDATION AS A MODEL SYSTEM FOR RIPENING RESEARCH.

Realizada bajo la tutorización de JOSÉ ÁNGEL MERCADO CARMONA y dirección de ANTONIO JAVIER MATAS ARROYO Y ENRIQUETA MOYANO CAÑETE

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 03 de SEPTIEMBRE de 2020

Fdo.:





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Antonio Javier Matas Arroyo, Profesor Titular del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y Enriqueta Moyano Cañete, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

Informan

que Pablo Daniel Ric Varas, Licenciado en Biología ha realizado en el Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga, y el Departamento de Fruticultura del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC), bajo su dirección, el trabajo de investigación que con el título “**Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) ripening: Functional characterization of genes of biotechnological interest and cell culture validation as a model system for ripening research**” presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga.

Para que conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, extendemos el presente informe autorizando la defensa.

03 de Septiembre de 2020

Fdo. Dr. Antonio Javier Matas Arroyo

Fdo. Dra. Enriqueta Moyano Cañete



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

José Ángel Mercado Carmona, Catedrático del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga, como Tutor del alumno D. Pablo Daniel Ric Varas

## INFORMA

Que el trabajo titulado “Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) ripening: Functional characterization of genes of biotechnological interest and cell culture validation as a model system for ripening research”, realizado por D. Pablo Daniel Ric Varas, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.

Málaga, 2 de septiembre de 2020



Fdo. José Ángel Mercado Carmona  
Tutor de la Tesis



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

La presente Tesis Doctoral ha sido desarrollada dentro del grupo de investigación de Mejora y Biotecnología de Especies Hortofrutícolas (AGR-226) en el Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y en el Departamento de Fruticultura del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC).

Ha sido financiada por los proyectos de investigación “Identificación y análisis funcional de genes que regulan procesos relacionados con la calidad organoléptica y las características estructurales del fruto de fresa” (AGL2014-55784-C2-1-R, Ministerio de Economía y Competitividad), y “Caracterización funcional de genes reguladores de la maduración en fresa y aplicación del sistema CRISPR/Cas9 para alargar la vida postcosecha y mejorar la calidad del fruto” (AGL2017-86531-C2-1-R, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad).

El doctorando ha sido beneficiario de una ayuda de Formación de Personal Investigador de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación del Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2015-073616). Esta beca incluye financiación para realizar estancias en centros de investigación de calidad fuera de España, con la que el doctorando pudo realizar parte de su trabajo en la Universidad de Leeds (UK). Además, en el marco de esta beca, disfrutó de otra ayuda para Estancias de investigadores de la Universidad de Málaga en centros de investigación de calidad, en concreto, en la Universidad de Córdoba.

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el XIV Cell Wall Meeting (Junio 2016, Chania, Grecia); 5th Plant Genomics & Gene Editing Congress (Marzo 2017, Ámsterdam, Holanda); XXII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal / XV Spanish Portuguese Congress of Plant Physiology (Junio 2017, Barcelona, España); XIV Reunión de Biología Molecular de Plantas (Julio 2018, Salamanca, España) y en XV Cell Wall Meeting (Julio 2019, Cambridge, Reino Unido).

Parte de los resultados de esta Tesis se han publicado en la revista *Plants*. Además, algunos aspectos de esta Tesis han contribuido a una publicación en la revista *Plos One*:

- Ric-Varas, P., Barceló, M., Rivera, J.A., Cerezo, S., Matas, A.J., Schückel, J., Knox, J.P., Posé, S., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A. (2020). Exploring the use of fruit callus culture as a model system to study color development and cell wall remodeling during strawberry fruit ripening. *Plants*, 9 (7): 805. <https://doi.org/10.3390/plants9070805>
- Moyano, E., Martínez-Rivas, F.J., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Ric-Varas, P., Matas, A.J., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Rodríguez-Franco, A. (2018). Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of the *Fragaria x ananassa* fruits. *Plos One*, 13 (5): e0196953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196953>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Agradecimientos

Durante estos últimos 5 años el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido una de mis prioridades, provocando que esta etapa haya sido determinante en mi vida. Por esto, me gustaría escribir unas palabras a las personas que se han cruzado conmigo en este tiempo y de algún modo me han ayudado a conseguir esta meta.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Antonio y Enriqueta, que me hayan dado la posibilidad de realizar esta tesis. También quería agradecerles el trato cercano y todos los consejos que me han dado para la escritura de este manuscrito, ya que gracias a ello siento que he podido crecer/madurar profesionalmente.

Me gustaría agradecer especialmente a José Ángel haberme dado tanto, aunque conste en esta tesis como tutor para mí siempre ha sido mucho más, ha sido un referente a seguir tanto por el trato humano como por el ámbito meramente profesional. Me abriste la puerta del laboratorio cuando no tenía ninguna experiencia, me valoraste el trabajo bien hecho cuando tocaba y, cuando no, lejos de agobiarme siempre supiste decirme las palabras indicadas para tranquilizarme, darme ánimos y hacer que volviera a repetir las cosas con otra actitud. Gracias también por los momentos tan especiales vividos fuera de la Universidad, en concreto en los dos congresos internacionales (aunque no me dejaste manejar la barca). ¡Gracias José por todo!

Quiero mencionar también a todos los compañeros del laboratorio, tanto por las ayudas recibidas durante este tiempo como por las cervezas que nos hemos tomado juntos mientras nos apoyábamos mutuamente. Tanto los que están actualmente, Isa, Luis, Jordi, Elena, Cristina, Marta, Laia, Manuel y Miguel; como los que ya se fueron del grupo, Sergio, Héctor, Anabel, Sara, Cristina, Delia, Juan y Miguel. Habéis sido grandes compañeros que aparte de ayudarme en lo posible siempre os habéis preocupado por mí. También quiero agradecer a todos los compañeros que se han encargado de las fresas en Churriana, que además de aprender de ellos sobre "trabajo de campo" he vivido momentos que no se me olvidarán, en especial a Pepa y José Manuel, por su implicación y su amabilidad. Tampoco me quiero olvidar de todos los TFG y TFM que pasaron por allí, pues todos se adaptaron bien y contribuyeron al buen ambiente. También quiero agradecer a todo el personal del departamento su predisposición a ayudarme en todo lo posible y a la buena relación que han mantenido conmigo durante este tiempo que ha hecho que me sienta como en casa: Nieves, Fernando, Lourdes, José Antonio, Rafa, Miguel Ángel, Carolina y María Jesús, Gracias.

Me gustaría agradecer especialmente a Sara que aparte de ayudarme con todo lo que ha podido desde su experiencia y de transmitirme siempre energía positiva, fue muy "pesá" para convencerme de hacer la estancia de 3 meses en Leeds. Le tenía mucho miedo a irme fuera y a base de insistirme me convenciste para no dejar escapar lo que considero una de las mejores experiencias que he tenido durante este periodo. Además, te preocupaste como la que más y te aseguraste de que estuviera cómodo allí, con visita incluida. Nunca me olvidaré

de lo mucho que me has ayudado y de los momentos vividos en UK (aunque tampoco me dejaste llevar la barca jaja).

Otra mención aparte merece Gloria, pues hemos trabajado "codo con codo" durante gran parte del desarrollo de la tesis y siempre ha estado dispuesta a ayudarme en todo lo que ha podido. Si echo la vista atrás recuerdo nuestras interminables charlas en el despacho, todas las risas que nos hemos echado, y todos los objetivos que conseguimos cumplir trabajando juntos. Ha sido un placer trabajar contigo, Gracias.

También me gustaría agradecer a los integrantes de los departamentos de Bioquímica, Fisiología animal, Ecología, y Genética (a los cuales no puedo nombrar uno a uno porque por suerte son demasiados) que me dejaran hacer uso de máquinas y reactivos necesarios para llevar a cabo algunos procedimientos de la tesis, así como el buen trato que siempre me dieron.

Quiero agradecer a todos los compañeros de la Universidad de Córdoba toda la ayuda prestada (que no fue poca) y sobre todo el haberme hecho reír tanto a pesar de las largas y duras jornadas de trabajo. Desde el primer minuto me sentí como en casa, nunca me olvidaré: Félix, Javi, Charo, Fran, Aymán, JJ, Pepe y José Luis. Juan, a ti me gustaría agradecerte el haberme abierto las puertas de tu laboratorio, las discusiones científicas que tuvimos y de las que tanto aprendí y el haberme tratado como otro integrante más de tu grupo. Gracias "team de UCO" por tanto!

I cannot forget the colleagues I had in Leeds for 3 months. Everyone, without exception, treated me great making me feel at home without giving importance to my low level of English. Paul I would like to thank you for your hospitality, your interest in my work and all the advice you gave me. Sue I can only say thank you, thank you and more thanks, you showed concern for my wellness from the first moment, you helped me with the language, you helped me with the bureaucracy and you helped me with my integration in the laboratory and in the department, those things that I will never forget. I would like to thank Yoselin for her good treatment allowing me to participate in her group meetings and treating me like one more, with shuffleboard matches included. She also helped me in everything she could, such as writing a recommendation letter for me or gives me contacts from other groups, Thanks. Phil, Sam, Jumana, Liam, Hendrik and Nathan, Thanks for everything!

Especialmente importante en mi estancia fue Candelas. Cuando fui allí me esperaba encontrar una antigua compañera que me ayudaría a instalarme en el laboratorio, pero lo cierto es que encontré mucho más, encontré una amiga. Gracias Candelas por todo, que te voy a decir que no sepas, hemos vivido tanto en tan poco tiempo que creo que sobran las palabras, sé que puedo contar contigo para todo, pero quiero que tengas claro que yo estaré aquí para todo lo que necesites. También quiero agradecer a Willy

el haberme acogido en su casa, el enseñarme el Sellar Bar, y en definitiva, haberme hecho pasar tan buenos momentos. Tampoco me quiero olvidar de Diego con el que pasé grandes momentos en UK, ni de Gabi, que fue un gran compañero de piso.

Quiero agradecer a mis amigos que, a pesar de no saber muy bien lo que hago o de no entender lo estresante que puede llegar a ser este trabajo, siempre me apoyaron y siempre tuvieron palabras para animarme o sacarme una sonrisa. Quiero destacar a Laura que durante gran parte de la tesis fue mi principal apoyo y, a pesar de que nuestros caminos se separaran, siempre estaré agradecido por todo lo que pude crecer junto a ella y por todos los momentos que me regaló. Quiero destacar también a mis amigos que llevan toda la vida siendo mis amigos, y que aunque nos tiremos la "tira" de tiempo sin hablar nunca cambia la complicidad que siempre hemos tenido, destacando a Titi, Juanan, Pablo y Manuel porque estuvieron más presentes en este periodo de tiempo, gracias por todos los momentos vividos y gracias por hacerme ser como soy. Pedro no me olvidó de ti, fuiste lo mejor que me llevé de Granada, me has demostrado tanto... Eres el amigo que toda persona quiere tener, estás ahí cuando se te necesita, te preocupas por mis problemas como si fueran tuyos, me intentas comprender cuando nadie me comprende, me haces sentir una persona importante en tu vida compartiendo tus alegrías conmigo y haciéndome saber que pase lo que pase estarás ahí. Gracias por todo amigo. Quiero agradecer a Estrella lo buena compañera de trabajo que fue, eras la alegría del laboratorio y que todo el mundo te quisiera tener cerca no es casualidad. Por suerte he podido disfrutar de tu compañía fuera del trabajo y, es que poco a poco, has ido convirtiéndote en uno de mis principales apoyos en esta ardua etapa de mi vida. Gracias por darme tanto, gracias por darme tu apoyo incondicional y gracias por regalarme tantos momentos mágicos. Gracias.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo mostrado, que a pesar de no saber muy bien cómo ayudarme en algunos momentos, han hecho todo lo que han podido. A mis padres que siempre están ahí, apoyándome, animándome y valorándome. Siempre habéis confiado en mí y no hace falta decir que parte de esta tesis es fruto de vuestro esfuerzo, Gracias. A mi hermano, que a pesar de no tener una relación estrecha con él, cuando ha hecho falta siempre ha estado ahí, Gracias. Y a mis tíos Pepi y Ramón que siempre han cuidado de mí y me han ayudado en todo lo que han podido, Gracias.

Por suerte son demasiadas las personas que durante este tiempo tuvieron un buen gesto hacia mí, solo he nombrado las personas que han estado más presentes pero son muchos más los que de alguna forma han contribuido a que pueda desarrollar este trabajo. A todas esas personas que injustamente no han sido nombradas, de corazón, Gracias.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

A mis abuelos  
*Ángel y María*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# Índice

Tabla de abreviaturas.....	21
----------------------------	----

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL ..... 23**

I.1 La fresa: Botánica e historia.....	25
I.2 Importancia económica.....	25
I.3 Planes de mejora.....	27
I.4 Principales cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración.....	28
I.5 Pared celular.....	30
I.6 Cambios en la pared celular durante la maduración.....	33
I.7 Factores de transcripción en la maduración de la fresa.....	36
I.8 Uso de cultivos celulares para el estudio de la maduración.....	38

## **OBJETIVOS ..... 41**

## **CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *FANAC2* Y *FANAC3* EN FRUTOS DE *F. X ANANASSA* DUCH. 'CHANDLER' ..... 43**

II.1 INTRODUCCIÓN.....	45
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
II.2.1 Generación de líneas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. 'Chandler' con los genes <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> silenciados por ARNi.....	49
II.2.1.1 Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	49
II.2.1.2 Transformación genética de <i>A. tumefaciens</i> mediante choque térmico.....	49
II.2.1.3 Transformación genética de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. 'Chandler' mediante <i>A. tumefaciens</i> .....	50
II.2.1.4 Regeneración y multiplicación de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. 'Chandler'.....	50
II.2.1.5 Aclimatación.....	51
II.2.1.6 Multiplicación por estolones.....	51
II.2.2 Análisis del fenotipo de los frutos obtenidos de las líneas con <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> silenciados.....	51
II.2.3 Análisis expresión génica en frutos con el gen <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> silenciados.....	52
II.2.3.1 Preparación del material.....	52
II.2.3.2 Extracción ARN.....	52
II.2.3.3 Tratamiento con <i>DNasa</i> .....	53
II.2.3.4 Purificación de ARN.....	53
II.2.3.5 Retrotranscripción.....	53
II.2.3.6 Reacción de amplificación por PCR a tiempo real a partir de ADNc.....	54
II.2.3.7 Análisis transcriptómico.....	54
II.2.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
II.2.3.9 Electroforesis gel de agarosa.....	56
II.2.3.10 Purificación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.....	57
II.2.4 Clonación y subclonación de los genes <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> .....	57
II.2.4.1 Diseño de cebadores.....	57
II.2.4.2 Clonación en el plásmido pDONR™ 221.....	57
II.2.4.3 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	58
II.2.4.4 Obtención y purificación de ADN plasmídico.....	59

II.2.4.5 Subclonación a otros plásmidos .....	59
II.2.5 Estudio de interacción de proteínas en levadura con FaNAC2 y FaNAC3 .....	61
II.2.5.1 Transformación de levadura a pequeña escala .....	61
II.2.5.2 Extracción de ADN plasmídico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
II.2.5.3 Transformación genética a gran escala de levaduras .....	62
II.2.5.4 Ensayo autoactivación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	63
II.2.6 Sublocalización celular de las proteínas FaNAC2 y FaNAC3 .....	64
II.2.6.1 Predicción de localización subcelular .....	64
II.2.6.2 Transformación transitoria de epidermis de cebolla mediante biolística .....	64
II.2.7 Estudio de pared celular.....	66
II.2.7.1 Extracción de la pared celular .....	66
II.2.7.2 Preparación de la pared celular para el fraccionamiento.....	67
II.2.7.3 Fraccionamiento de la pared celular .....	67
II.2.7.4 ELISA .....	68
II.2.7.5 Cromatografía de intercambio aniónico para la detección de epítomos (EDC)...	69
II.2.8 Análisis estadístico.....	71
II.3 RESULTADOS .....	73
II.3.1 Transformación, regeneración y aclimatación de plantas de fresa <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. 'Chandler' con los genes <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> silenciados .....	73
II.3.2 Niveles relativos de expresión génica.....	73
II.3.3 Seguimiento del desarrollo y la maduración de los frutos .....	74
II.3.4 Fenotipado.....	76
II.3.5 Ensayo de autoactivación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	84
II.3.6 Localización subcelular de FaNAC2 y FaNAC3.....	86
II.3.6.1 Predicción de localización subcelular .....	86
II.3.6.2 Biolística .....	87
II.3.7 Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN.....	88
II.3.8 Caracterización de la pared celular de frutos maduros con <i>FaNAC2</i> y <i>FaNAC3</i> silenciado.....	98
II.4 DISCUSIÓN.....	103
II.4.1 Influencia de FaNAC2 y FaNAC3 en el tamaño del fruto .....	103
II.4.2 Posible papel de FaNAC2 y FaNAC3 en la acumulación de pigmentos y de azúcares en el fruto de fresa durante la maduración .....	106
II.4.3 Influencia de FaNAC2 y FaNAC3 en la composición de la pared celular.....	111

## **CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DEL GEN *FARGLYASE 1* EN FRUTOS DE *F. X ANANASSA* DUCH. 'CHANDLER' ..... 119**

III.1 INTRODUCCIÓN .....	121
III.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	125
III.2.1 Material vegetal .....	125
III.2.2 Fenotipado.....	125
III.2.3 Análisis transcriptómico.....	125
III.2.3.1 Preparación del material .....	125
III.2.3.2 Extracción ARN .....	126
III.2.3.3 Tratamiento con <i>DNAsa</i> .....	126
III.2.3.4 Purificación de ARN .....	126
III.2.3.5 Análisis transcriptómico.....	126
III.2.4 Estudio de pared celular.....	127
III.2.4.1 Extracción de pared celular .....	127
III.2.4.2 Fraccionamiento de la pared celular .....	127
III.2.4.3 Cuantificación de azúcares ácidos.....	128

III.2.4.4 Cuantificación de azúcares neutros .....	128
III.2.4.5 Microarrays de pared celular .....	129
III.2.4.6 Ensayo inmunofluorescente en tejido histológico .....	131
III.2.5 Análisis estadístico y representación de gráficos .....	134
<b>III.3 RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
III.3.1 Análisis del fenotipo de los frutos obtenidos de las líneas con el gen <i>FaRGlyase 1</i> silenciado.....	135
III.3.2 Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN.....	139
III.3.3 Caracterización de la pared celular de los frutos transgénicos .....	141
<b>III.4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>153</b>

**CAPÍTULO IV: EXPLORANDO EL USO DEL CULTIVO DE CALLOS  
PROCEDENTES DE RECEPTÁCULO COMO SISTEMA MODELO PARA ESTUDIAR  
LA ACUMULACIÓN DE PIGMENTOS Y LA REMODELACIÓN DE LA PARED  
CELULAR DURANTE LA MADURACIÓN DE LA FRESA..... 161**

IV.1 INTRODUCCIÓN .....	163
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
IV.2.1 Material vegetal y formación de callos.....	165
IV.2.2 Efecto del ABA en la producción de antocianinas .....	165
IV.2.3 Análisis de pared celular .....	166
IV.2.3.1 Extracción de la pared celular.....	166
IV.2.3.2 Microarrays de perfiles completos de polímeros (CoMPP) .....	166
IV.2.3.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	168
IV.2.4 Análisis estadístico .....	168
<b>IV.3 RESULTADOS.....</b>	<b>169</b>
IV.3.1 Efecto del equilibrio hormonal y del tipo de explanto en el desarrollo del callo .....	169
IV.3.2 Efecto del ABA en la producción de antocianinas .....	172
IV.3.3 Análisis de la composición de la pared celular por CoMPP .....	173
<b>IV.4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>181</b>
IV.4.1 Desarrollo de los cultivos de callos a partir de receptáculos de fresa.....	181
IV.4.2 Producción de antocianinas en líneas celulares procedentes de receptáculo .....	181
IV.4.3 Caracterización de paredes celulares procedentes de cultivos celulares .....	182

**CONCLUSIONS .....** **185**

**SUMMARY OF THE THESIS IN ENGLISH .....** **187**

**BIBLIOGRAFÍA.....** **213**

**ANEXO.....** **243**





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Tabla de abreviaturas usadas con frecuencia en el manuscrito

Abreviatura	Término completo
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
9LOX	linolato 9S lipoxigenasa
ABA	ácido abscísico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AGP	proteínas arabinogalactanos
AGs	arabinogalactanos
ARNi	ácido ribonucleico interferente
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
BA	benciladenina
CDTA	ácido ciclohexano diamino tetraacético
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas
FT/FTs	factor de transcripción/(es)
GA2ox/GA3ox	giberelina 2- $\beta$ -dioxigenasa/giberelina 3- $\beta$ -dioxigenasa
GDR	<i>Genome Database Rosaceae</i>
HG	homogalacturonano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
PAL	fenilalanina amonio liasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDCB	<i>plasmodesmata callose-binding protein</i>
PEG	polietilenglicol
PG	poligalacturonasa
PIPES	piperazina-N,N'-bis
PL	pectato liasa
PME	pectin metil esterasa
PRPR	proteína rica en repetición de prolina
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RG-1	ramnogalacturonano I
RG-2	ramnogalacturonano II
rpm	revoluciones por minuto
XEH	xiloglucano hidrolasa
XET	xiloglucano endotransglicosilasa
XG	xiloglucanos
XTH	xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa



# Capítulo I: Introducción general



## Capítulo I: Introducción general

### I.1 La fresa: Botánica e historia

El género *Fragaria* (fresa), perteneciente a la familia Rosaceae, contiene 24 especies. En todas ellas el genoma se distribuye en 7 cromosomas ( $x = 7$ ), de los cuales las especies tienen diferente número de copias: 13 especies son diploides (incluyendo la especie modelo *Fragaria vesca*), 5 especies son tetraploides, 1 especie es hexaploide y 3 especies son octoploides donde se incluyen *F. chiloensis*, *F. virginiana* y el híbrido *Fragaria x ananassa*. Otras especies registradas han sido *F. x bringhurstii* (pentaploide) y *F. iturupensis* (decaploide) (Staudt, 2009; Hummer, 2011).

*Fragaria x ananassa* Duch. es una de las plantas domesticadas más recientes. Su origen está documentado por el botánico Antoine Nicolas Duchesne en el año 1766 en su obra "Natural History of Strawberries". Dicha variedad se originó por una hibridación entre *F. virginiana* de Norte América y *F. chiloensis* de Suramérica en el siglo XVIII (Liston et al., 2014). Los frutos de estos híbridos eran fácilmente reconocibles por sus características distintivas y generalmente deseables, incluyendo un tamaño considerablemente mayor que los de especies silvestres (Darrow, 1966). Estas características han hecho que hoy día, *F. x ananassa* Duch. sea la especie más importante económicamente del género *Fragaria* (Hummer y Hancock, 2009).

Las fresas son plantas perennes, aunque normalmente se usan en campo como plantas anuales, ya que la producción es mayor y de más calidad en plantas jóvenes. El cuerpo de la planta está formado por una corona y un tallo, que produce hojas, flores, estolones (para propagación vegetativa), raíces y coronas axilares. La inflorescencia es un tallo modificado con una flor terminal o flor primaria, y generalmente con flores secundarias, terciarias y cuaternarias que surgen lateralmente de este tallo (Darnell et al., 2003).

Estas flores contienen estambres y pistilos unidos a un receptáculo. Cuando se produce la fertilización de óvulos en los ovarios, se induce un agrandamiento del receptáculo, haciéndose más carnoso y atractivo. Este receptáculo contiene numerosos aquenios, representando cada aquenio un fruto, ya que en el interior se encuentran las semillas (Perkins-Veazie, 1995). A pesar de esto, debido a que el receptáculo es carnoso, y es lo que se consume, es nombrado erróneamente como fruto.

### I.2 Importancia económica

Estos falsos frutos están muy demandados por los consumidores, llegando a tener una alta importancia económica para ciertos países. Para abastecer dicha demanda se han superado los 2,5 millones de toneladas de producción en China, líder de producción mundial, en el año 2018, seguida de Estados Unidos, México, Turquía y Egipto. España, por su parte, es el 6º país con mayor producción de fresas, con 345000 toneladas de producción (FAOSTAT, 2020) (Figura 1.1).

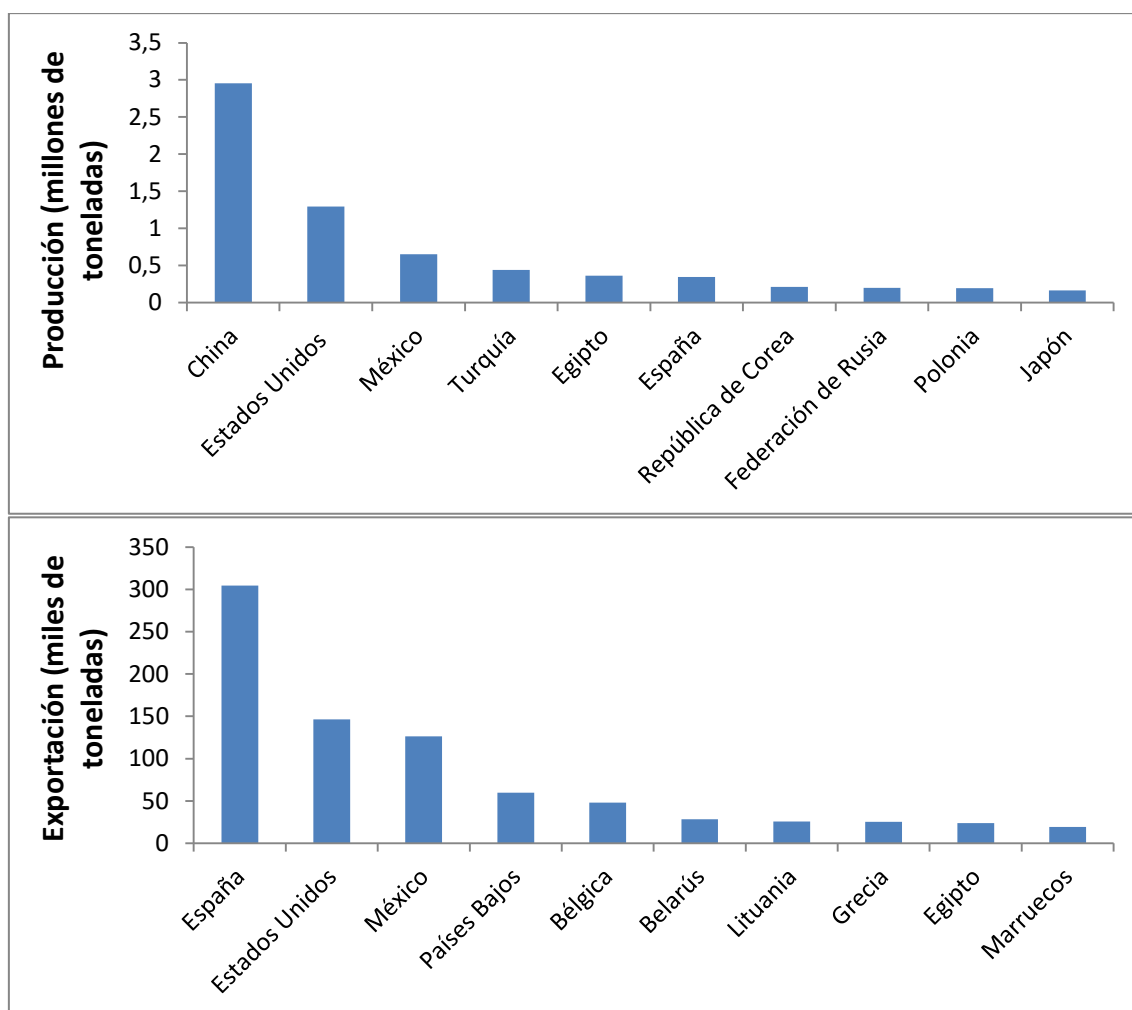


Figura 1.1: (Arriba) Cantidad de fresas producidas (millones de toneladas) en el año 2018 por los 10 países con mayor producción. (Abajo) Cantidad de fresas exportadas (miles de toneladas) en el año 2017 por los 10 países con más exportaciones (extraída de [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity)).

En cuanto a las exportaciones, España lidera el ranking tanto en cantidad como en valor económico, recaudando en 2017 más de 600 millones de euros por dichas exportaciones. Tras España están Estados Unidos, México, Países Bajos y Bélgica (FAOSTAT, 2020) (Figura 1.2).

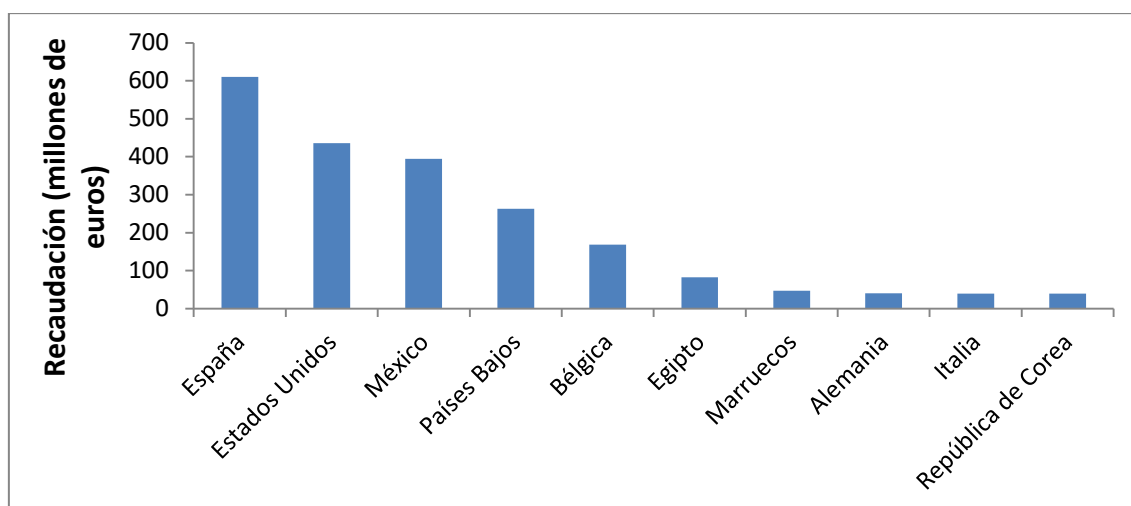


Figura 1.2: Cantidad de euros (millones) recaudados de las exportaciones de fresas realizadas en el año 2017 por los 10 países que más se beneficiaron de esta actividad (extraída de [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity\\_exports](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity_exports)).

La alta demanda del fruto de fresa se debe por un lado a sus propiedades organolépticas: sabor dulce, aroma atractivo, textura suave y color rojo llamativo (Skrovankova et al., 2015) y, por otro lado, a sus propiedades nutricionales. De sus propiedades nutricionales cabe destacar: un alto contenido en fibra, teniendo un efecto saciante sin aportar muchas calorías; un alto contenido en vitamina C, siendo una de las mejores fuentes naturales de esta vitamina y un alto contenido en folato, el cual es un micronutriente esencial. También es importante la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y antocianinas, los cuales son potentes antioxidantes (Giampieri et al., 2012).

Estas propiedades nutricionales hacen que este fruto sea beneficioso para la salud. Por ejemplo, se ha descrito su uso tópico para curar enfermedades y heridas en la piel (Kunwar et al., 2010), como anti-inflamatorio, astringente y diurético (Giampieri et al., 2015), y además por su alto contenido en antioxidantes en la ayuda a disminuir el riesgo de problemas cardiovasculares mediante la inhibición de la oxidación de LDL-colesterol, reduciendo el riesgo de trombosis (Basu et al., 2010; Prasath y Subramanian, 2014). También los compuestos puros de antocianinas como la pelargonidina, además de ser antioxidantes evitan la proliferación *in vitro* de células tumorales humanas, pudiendo ayudar a evitar el cáncer de colon y de próstata (Zhang et al., 2008; Casto et al., 2013).

### 1.3 Planes de mejora

La fresa se considera un fruto no climatérico, por lo que el etileno parece que no juega un papel clave en la maduración del fruto. Esto hace que la fresa no se pueda cosechar en estadio inmaduro y, tras el transporte y almacenamiento, inducir su maduración aplicando dicha hormona (Given et al., 1988a). Esto, unido a que la fresa es un fruto blando de vida poscosecha corta (Paniagua et al., 2017), hacen que se

generen importantes pérdidas durante el transporte y almacenamiento de estos frutos, conllevando grandes consecuencias en la economía de los agricultores y distribuidores (Prasanna et al., 2007).

Actualmente, se están realizando grandes esfuerzos por mejorar esta especie y así poder aumentar los beneficios económicos. Los planes de mejora tanto por mejora genética tradicional como por la obtención de líneas transgénicas siguen fundamentalmente 2 vías: una de ellas orientada a la mejora de las propiedades nutricionales, consiguiendo de esta forma un producto de mayor valor (Aharoni et al., 2000; Capocasa et al., 2008; Diamanti et al., 2012; Fredericks et al., 2013; Diamanti et al., 2014; Schwieterman et al., 2014; Yan Wang et al., 2017; Barbey et al., 2019; Whitaker et al., 2020) y otra vía de mejora orientada a reducir la pérdida de material en el transporte y almacenamiento de los frutos, buscando alargar la vida poscosecha, reduciendo así las pérdidas económicas (Sallato et al., 2007; Matsumoto et al., 2010; Hwang et al., 2012; Gol et al., 2013; Romanazzi et al., 2013; Wang y Gao, 2013; SunEun et al., 2014). En este aspecto se han realizado numerosos estudios relacionados con genes involucrados en el reblandecimiento del fruto durante la maduración (Prasanna et al., 2007; Paniagua et al., 2017; Moya-León et al., 2019; Posé et al., 2019) así como genes involucrados en la defensa frente a patógenos (Amil-Ruiz et al., 2011, 2016; Higuera et al., 2019; Whitaker et al., 2020).

#### **I.4 Principales cambios fisiológicos y bioquímicos durante la maduración**

A lo largo de la vida del receptáculo de fresa es la combinación regulada de la biosíntesis y acción de 5 fitohormonas lo que regula el proceso de desarrollo y maduración: ácido abscísico (ABA), auxina, giberelina, citoquininas y etileno (Gu et al., 2019).

En general, el ABA ha sido propuesto como la principal hormona promotora del proceso de maduración, ya que es biosintetizada principalmente en el receptáculo de fresa y su cantidad aumenta conforme avanza el desarrollo y la maduración del fruto (Symons et al., 2012; Gu et al., 2019). Además, ha sido demostrada su capacidad de inducir la expresión de enzimas degradantes de la pared celular y de enzimas encargadas en la biosíntesis de antocianinas, ambos procesos relacionados con el reblandecimiento y la coloración, respectivamente, características de la fresa en estadio maduro (Bustamante et al., 2006; Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Molina-Hidalgo et al., 2013; Nardi et al., 2014).

La auxina ha sido propuesta como hormona antagonista del ABA, ya que induce la división celular temprana, cuando el fruto comienza a desarrollarse, e inhibe procesos de maduración como son la acumulación de antocianinas y la reducción de firmeza del fruto (Given et al., 1988a; Symons et al., 2012; Gu et al., 2019). Además, la auxina se sintetiza principalmente en el aquenio, y su acción en receptáculo va decreciendo conforme avanza la maduración, teniendo su pico más alto en estadio verde temprano (Symons et al., 2012; Liao et al., 2018; Gu et al., 2019). En consonancia, se ha propuesto que la auxina, en sinergia con las giberelinas, promueven el catabolismo de ABA en las etapas tempranas del receptáculo de fresa, evitando una maduración precoz y promoviendo la división y expansión celular (Liao et al., 2018).

Las giberelinas, como se ha comentado, parecen promover la expansión celular, y actúa de forma coordinada con la auxina para activar el catabolismo de ABA en estadios inmaduros de receptáculo. Su síntesis y su ruta de actuación parecen ir incrementando durante el desarrollo del fruto, hasta que alcanza su pico máximo en estadios tardíos de receptáculo verde o estadios tempranos de receptáculo blanco, y reduciéndose en etapas posteriores (Csukasi et al., 2011; Symons et al., 2012; Liao et al., 2018; Gu et al., 2019).

El etileno, por su parte, comienza a incrementar en receptáculo de fresa a partir de estadio tardío verde, y ha sido propuesto, a pesar de que es considerado un fruto no climatérico, como promotor de la maduración debido al incremento de la expresión de 5 receptores en estadios avanzados de maduración, y a que su acción varía la expresión de enzimas modificadoras de la pared celular (Villarreal et al., 2010; Merchante et al., 2013; Sun et al., 2013; Villarreal et al., 2016; Sánchez-Sevilla et al., 2017; Gu et al., 2019).

En cuanto a las citoquininas es controvertido el papel que puedan ejercer en la maduración del fruto. En el caso de la uva, también considerado como fruto no climatérico, parece tener un papel importante en la maduración. Sin embargo, en fresa no está claro ya que los niveles de citoquininas son bajos en receptáculos y van disminuyendo conforme avanza la maduración (Symons et al., 2012). No obstante, Gu et al. (2019) detectaron un pico de esta hormona en la fresa madura, aunque también observaron la represión de la ruta de señalización de esta hormona, por lo que dejan la puerta abierta a una posible función en la maduración. Kano y Asahira (1979), propusieron que el papel de esta hormona está relacionado con el desarrollo de estadios tempranos del receptáculo, inhibiendo el proceso de maduración.

Otra familia de hormonas menos caracterizada en fresa pero que podría intervenir en la maduración son los brasinoesteroides (Bombarely et al., 2010; Chai et al., 2012). Chai et al. (2012) han comprobado que aplicando de forma exógena el inhibidor de los brasinoesteroides brasinazol se provoca que el fruto de la fresa no madure correctamente produciéndose frutos verdes grandes. Sin embargo, también han comprobado que elementos de dichas hormonas alcanzan su pico de expresión en etapas tempranas del desarrollo, por lo que no está claro el papel de dichas hormonas en el desarrollo y maduración del fruto.

Durante el desarrollo y maduración de la fresa la regulación hormonal comentada provoca que se produzcan una serie de cambios que hacen de esta un fruto atractivo. Los principales cambios que se dan son la degradación de la clorofila, la biosíntesis de pigmentos y compuestos volátiles, la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos, y un reblandecimiento de la textura (Giovannoni, 2001). Para el consumidor, la textura es el principal atributo de calidad en el fruto (Goulao y Oliveira, 2008), por lo que es importante que dicho fruto se mantenga con una textura adecuada durante el mayor tiempo posible.

El desensamblaje de la pared celular durante la maduración por la acción secuencial de enzimas hidrolíticas es considerado el principal proceso responsable del reblandecimiento de los frutos y por consiguiente de la corta vida poscosecha (Mercado et al., 2011; Posé et al., 2019). Debido a esto, entender el mecanismo y la

dinámica que sigue la pared celular durante la maduración, se ha convertido en uno de los principales retos actualmente, para intentar conseguir frutos más duraderos sin afectar a otras propiedades organolépticas (Wang et al., 2018).

### I.5 Pared celular

Los componentes de la pared celular se pueden dividir en 3 dominios: 1 dominio formado por la red de celulosa y xiloglucanos (XG) (aproximadamente el 50 % del peso total de la pared celular), otro dominio formado por pectinas (aproximadamente un 30 % del peso, aunque es muy variable) y un dominio menos dominante formado por proteínas. Cada dominio es independiente y dinámico, es decir que dependiendo del estado de desarrollo celular, o de las condiciones ambientales, cada dominio puede aumentar o disminuir su síntesis y/o degradación (Carpita y Gibeaut, 1993) (Figura 1.3).

La celulosa es un polímero lineal de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4). Estos polímeros se aglomeran formando estructuras de microfibrillas de celulosa. Estas microfibrillas a su vez forman una red, siendo la base de la pared celular primaria (McCann et al., 1990).

Los XG también son cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), con la diferencia de que tienen enlazadas unidades xilosil sobre tres unidades contiguas de glucosilo (en la posición O-6) de la cadena principal, quedando el siguiente glucosilo de la cadena unido sin ramificar. También se puede unir galactosa y arabinosa a la posición O-2 de los grupos xilosil (Bacic et al., 1988). Los XG son propuestos como los principales puntos de anclaje de la pared celular, ya que forman un tapiz alrededor de las microfibrillas de celulosa, y ocupan el espacio libre entre microfibrillas de celulosa (McCann et al., 1990). Esta red de celulosa y XG está insertada en una red de pectinas (Carpita y Gibeaut, 1993).

Las pectinas son polímeros ricos en ácido galacturónico, que pueden poseer cadenas laterales (McCann et al., 2001). Dentro del dominio de la red de pectinas, el componente mayoritario es el homogalaturonano (HG), un polímero de 200 unidades de galactosilurónico con forma helicoidal. Estas cadenas pueden tener diferente grado de compactamiento entre sí, dependiendo en gran medida del grado de esterificación. Las unidades de galacturónico pueden estar metil esterificadas, teniendo una carga neutra, pero si se desesterifican, la unidad queda cargada negativamente. Esto hace, que si hay cationes  $\text{Ca}^{2+}$  cercanos, se formen uniones entre diferentes cadenas de HG. De esta forma, el grado de desesterificación y la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  condicionan el número de sitios de unión de los HG. A más sitios de unión, más compactación de estas cadenas (Goldberg et al., 1996).

Otro componente del dominio de pectinas es el ramnogalacturonano I (RG-1), formado por un esqueleto de dímeros (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$  - L - ramnosil - (1  $\rightarrow$  4)  $\alpha$  - D - galactosilurónico (Lau et al., 1985). Las unidades de ácido galacturónico pueden estar acetiladas y, además, se pueden disponer de forma continua saltándose las unidades de ramnosa. Estas unidades de ramnosa pueden interrumpir las largas cadenas de HG (Jarvis, 1984).

Esta columna vertebral tiene ramificaciones en la posición O-4 de muchas ramnosas, siendo estas ramificaciones arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (AGs). Dichas ramificaciones forman estructuras complejas: los arabinanos suelen unirse en la posición O-5, a unidades de arabinofuranosil, que a su vez pueden conectar entre sí (posiciones O-2, O-3, y O-5) formando un grupo diverso de ramificaciones de arabinanos.

Los galactanos y los AGs son cadenas más grandes. Hay dos tipos de AGs, los de tipo I, que se encuentran sólo en la fracción de pectinas, compuestos por cadenas de  $\beta$ -D-galactanos unidos por enlaces (1  $\rightarrow$  4), y en su mayoría, las unidades de galactosil están unidas a unidades t-arabinosil en la posición O-3 (Bacic et al., 1988); y los AGs de tipo II que están formadas por pequeñas cadenas de  $\beta$ -D-galactanos con uniones (1  $\rightarrow$  3) y (1  $\rightarrow$  6) conectadas a su vez, con otras cadenas por enlaces (1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6). La mayoría de posiciones O-3 y O-6 de los grupos galactosil están ocupadas por grupos t-arabinosil. Además, estos AGs de tipo II están asociados con proteínas ricas en hidroxiprolina "proteínas arabinogalactano" (AGP) (Fincher y Stone, 1986).

Hay una tercera pectina, llamada ramnogalacturonano II (RG-2), la cual es altamente compleja. Es la pectina minoritaria, pero aun así tiene una gran importancia en la integridad de la pared celular. Se han realizado varios estudios donde la alteración de esta pectina provoca graves consecuencias en las células (O'Neill et al., 2001, Ahn et al., 2006; Delmas et al., 2008).

La compleja estructura de esta pectina se basa en una cadena principal, de  $\alpha$  1,4 – homogalacturonano, de siete a nueve residuos sustituidos por hasta cinco cadenas laterales designadas por las letras A – E y que comprende 12 monosacáridos unidos por 20 enlaces (Pérez et al., 2003). La cadena E comprende un residuo de arabinosilo y las cadenas C y D son disacáridos. Por el contrario, las dos cadenas más grandes A y B, se han descrito como octa- y heptasacáridos altamente ramificados, respectivamente (Hervé du Penhoat et al., 1999; Glushka et al., 2003). Además, varios monosacáridos de estas cadenas están metilados y / o acetilados (Whitcombe et al., 1995). Este monómero de RG-2 se une a otro RG-2, formando un dímero a través de un enlace diéster mediante una molécula de boro (Pabst et al., 2013).

El componente principal del dominio de las proteínas es la extensina. Las extensinas tienen una secuencia repetitiva de serina (dominio Hyp) y un dominio formado por repeticiones de tirosina - lisina – tirosina. El dominio Hyp tiene forma de barra, mientras que las otra región es flexible, aunque puede endurecerse mediante la adición de grupos arabinosil (Cooper et al., 1987).

Otro componente del dominio proteico es la RPRP (proteína rica en repetición de prolina), la cual parece que juega un papel importante junto con la extensina, en la fijación estructural de la pared celular (Chen y Varner, 1985).

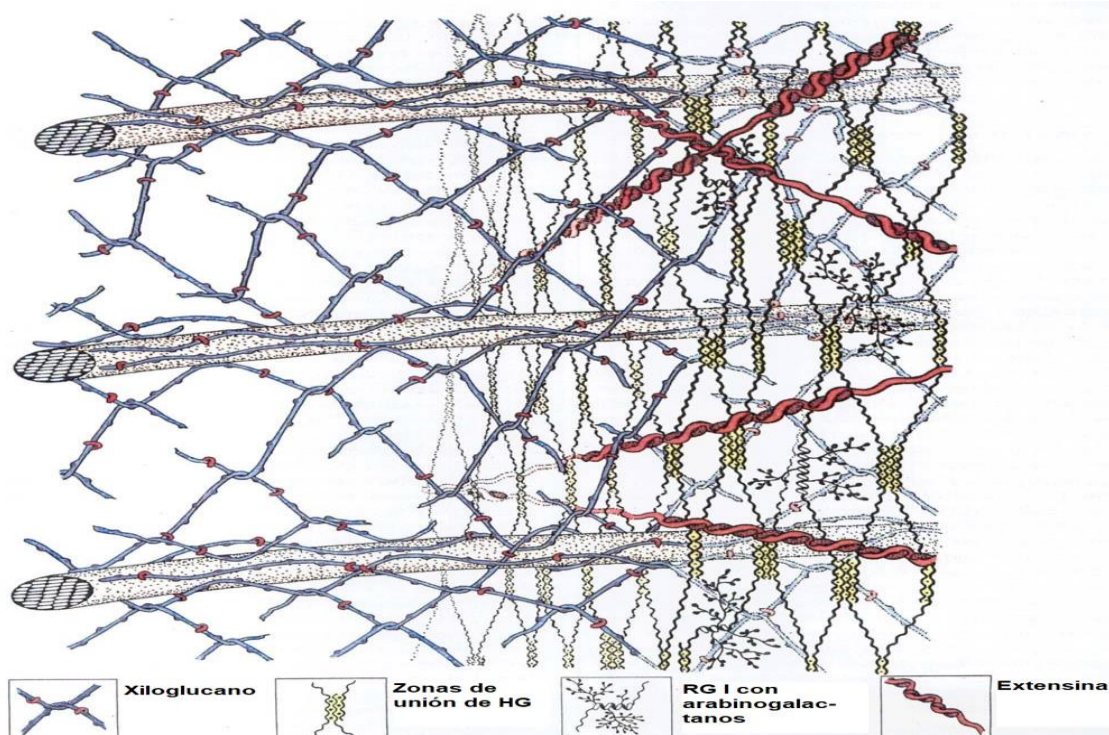


Figura 1.3: Modelo de pared celular adaptado a partir de Carpita y Gibeaut, (1993), donde se ve la interacción de los diferentes componentes descritos en el texto (permiso de reutilización número 4832131308209 concedido por John Wiley and Sons).

Este modelo de pared celular realizado por Carpita y Gibeaut (1993) ha sido discutido recientemente en el trabajo de Wang et al. (2018). Los cambios propuestos por el nuevo modelo se basan en que las conexiones entre las microfibrillas de celulosa y las pectinas son más frecuentes, de forma que ambos dominios no son independientes, pudiendo tener las pectinas la misma importancia en la fijación de la pared celular que los XG, considerados en el anterior modelo los principales fijadores de las microfibrillas de celulosa (Figura 1.4). Este modelo se basa en las siguientes evidencias: las cadenas laterales de arabinanos y galactanos de RG-1 pueden unirse a las microfibrillas de celulosa, con una afinidad similar al XG (Zykwinska et al., 2005); las interacciones entre pectinas y celulosa son más extensas de lo que se pensaba, mientras que las interacciones XG – celulosa no son tan frecuentes (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et al., 2012; Tuo Wang et al., 2015); además, se detectaron contactos de pectina con cadenas interiores de celulosa, sugiriendo que durante la síntesis se intercalan microfibrillas de celulosa con cadenas de HG, evidenciando aún más, la importancia de las pectinas en la estructura de la pared celular (Wang y Hong, 2016). Otra aportación importante, es la posibilidad de que los HG puedan tener ramificaciones, en contra de la visión de la estructura homogénea de HG (Round et al., 2010).

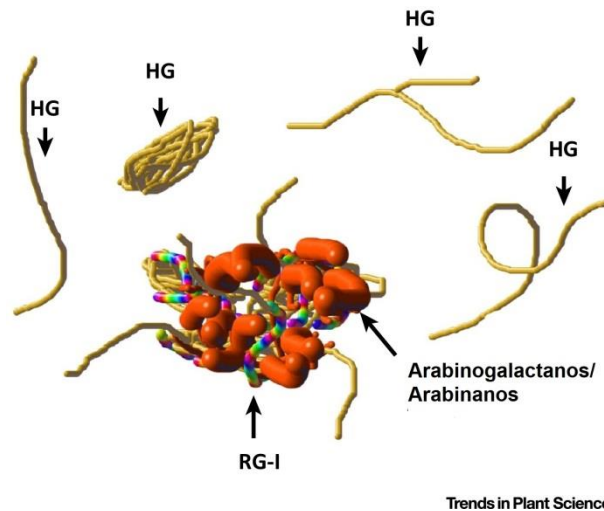


Figura 1.4: Representación de los tipos de moléculas de pectinas extraídas del pericarpo de tomate, y visualizados con microscopía de fuerza atómica (AFM). Se muestran las diferentes formas del HG: aislado (en amarillo), y con unidades de ramnosa (multicoloreado), al igual que RG-1. También se muestran los arabinogalactanos y arabinanos (naranja). Figura representada por Wang et al. (2018), con los resultados obtenidos en el trabajo de Round et al. (2010) (permiso de reutilización número 4831530855641 concedido por Elsevier).

Hay otros polisacáridos como glucomananos, galactoglucomananos, galactomananos, (1 → 3) β-D-glucanos o glucuronoarabinosilanos, que pueden jugar un papel importante en la fijación de la pared celular, pero se encuentran en mucho menor proporción.

## I.6 Cambios en la pared celular durante la maduración

Durante la maduración de los frutos, los polisacáridos de la pared celular se ven modificados por la acción secuencial y coordinada de una serie de enzimas (Moya-León et al., 2019). Las enzimas que están relacionadas con el reblandecimiento del fruto aumentan su expresión conforme avanza la maduración. La acción de estas enzimas son responsables del reblandecimiento del fruto, por el desensamblaje de la pared celular y de la reducción de la adhesión celular en consecuencia de la disolución de la lámina media (Brummell y Harpster, 2001; Brummell, 2006; Wei-Wei Zhang et al., 2020).

Los principales cambios son escisiones de cadenas principales poliméricas, eliminación de cadenas laterales o de unidades sueltas, eliminación de grupos metil éster o acetilo del HG y la ruptura de puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y el resto de glicanos (Paniagua et al., 2014).

Durante la maduración se produce una solubilización y/o despolimerización de pectinas y una pérdida de azúcares neutros de sus cadenas laterales (Figuerola et al., 2008). Esta solubilización de pectinas conlleva a un aumento de pectinas extraídas con agua y con agentes quelantes como ácido ciclohexano diamino tetraacético

(CDTA), y una disminución de pectinas unidas covalentemente en la pared primaria, extraídas con carbonato sódico (Posé et al., 2011).

Se han planteado diferentes hipótesis acerca del papel de las pectinas en la despolimerización de la pared celular (Paniagua et al., 2017).

Una de ellas es que, conforme avanza la maduración, se produce una despolimerización de las pectinas unidas covalentemente por la acción de enzimas como la poligalacturonasa (PG), pectin metil esterasa (PME) o la pectato liasa (PL), provocando un aumento de componentes solubilizados (Redgwell et al., 1997b; Rose et al., 1998; Vicente et al., 2007).

Otra hipótesis alternativa sería que las pectinas regulan el tránsito de enzimas despolimerizantes e hidrolizantes, regulando el tamaño del poro. Hay varias posibilidades acerca de cómo se produce dicha regulación: 1 - Se produce una pérdida de las cadenas laterales del RG-1, lo que provoca un debilitamiento de la pared celular (Redgwell et al., 1997a) y además aumenta la porosidad, lo que facilita el acceso de enzimas pectinasas (Smith et al., 2002; Paniagua et al., 2016). 2 - La apertura del poro puede estar causada por un descenso de pH, ya que conllevaría, más zonas de unión entre HG, lo que facilitaría el acceso de hidrolasas al sustrato y/o hidrolasas como xilosidasas o glucosidasas, regulando de forma indirecta el desensamblaje del dominio celulosa-XG (Baron-Epel et al., 1988; Carpita y Gibeaut, 1993).

También se propuso que la enzima PME, al realizar las desmetilaciones en el HG favorece la formación de más sitios de unión entre cadenas y la liberación de grupos ácidos al medio. Este descenso de pH facilitaría la acción de endoglucanasas específicas de XG, provocando su despolimerización (Moustacas et al., 1986; Nari et al., 1986).

Sin embargo, no está claro cuánto influye la despolimerización de las pectinas en el reblandecimiento del fruto. Hay estudios en los que no se observó una correlación entre la pérdida de firmeza durante la maduración y la despolimerización de las pectinas (Huber, 1984; Redgwell et al., 1997a; Lee et al., 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos por Rosli et al. (2004) sugieren que la solubilización y despolimerización de las pectinas tienen más peso en el reblandecimiento del receptáculo que el catabolismo de la celulosa o de los XG.

Se han realizado numerosos estudios con líneas transgénicas de *F. x ananassa*, donde se bloquean diferentes enzimas pectinasas para comprobar el efecto en la firmeza y vida útil del fruto. Quesada et al. (2009) estudiaron líneas con el gen de la enzima PG silenciado, enzima hidrolasa que actúa en las cadenas de ácido galacturónico, observando frutos más firmes y con una vida útil más larga. Similares conclusiones se obtuvieron con trabajos donde se reprimió la expresión de la enzima PL, una enzima que escinde poliurónidos desesterificados por eliminación de enlaces  $\beta$  (Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Santiago-Doménech et al., 2008). La nanoestructura de los frutos transgénicos de ambos trabajos fue analizada usando la microscopía de fuerza atómica y, en ambos casos, la represión de las pectinasas provocaba un aumento en la longitud de las pectinas, correlacionándose con el aumento de firmeza (Posé et al., 2015). También se ha silenciado la  $\beta$ -galactosidasa, enzima que hidroliza residuos terminales de los galactanos, provocando un aumento

en la cantidad de galactosa y una disminución en la despolimerización de los poliuronidos, conllevando un aumento de firmeza del receptáculo (Paniagua et al., 2016).

En el trabajo de Molina-Hidalgo et al. (2013) se caracteriza una ramnogalacturonano liasa específica de receptáculo (no se expresa en los achenios) de *F. x ananassa*, que muestra una expresión creciente conforme avanza la maduración. Esta enzima digiere el esqueleto principal de RG-1 y es regulada positivamente por ABA y negativamente por auxina. Los resultados obtenidos por transformación transitoria, indican que el RG-1 podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la lámina media y en la integridad de las células del parénquima. Su despolimerización podría ser fundamental en la disminución del área de contacto entre células y del aumento del espacio intercelular que ocurre con el reblandecimiento al avanzar la maduración de la fresa.

Estos resultados fueron corroborados en *Fragaria chiloensis*, donde el silenciamiento de una ramnogalacturonano liasa I provocó frutos con láminas medias más gruesas que los frutos control (Méndez-Yañez et al., 2020), y en tomate, donde la represión provocó un aumento de la firmeza de los frutos en estadio maduro y un alargamiento de su vida útil (Ochoa-Jiménez et al., 2018).

El resto de componentes de la pared celular también se ven afectados durante la maduración, aunque parecen menos determinantes en el reblandecimiento del fruto.

Los XG son despolimerizados por las enzimas xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XTH), pudiendo tener funciones como endotransglucosilasa (XET) y/o endohidrolasa (XEH). Sin embargo, en el trabajo de Nardi et al. (2014), se comprobó que los cultivares de fresa que tenían más transcrito de estas enzimas eran más firmes. Por lo que en contra de lo que se pensaba, la despolimerización de los XG, aporta más firmeza al fruto.

En cuanto a la celulosa, Koh y Melton, (2002) comprobaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear que no se ve alterada en el proceso de reblandecimiento durante la maduración de la fresa, por lo que parece que no juega un papel clave.

Otro componente de la pared celular cuya expresión aumenta conforme avanza la maduración, son las expansinas. Parece que su función es la de interrumpir uniones entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). Se han caracterizado 3 isoformas que aumentan su expresión conforme se reblandece el fruto de *F. chiloensis* (Figuerola et al., 2009). Recientemente, en el trabajo bioinformático de Valenzuela-Riffo et al. (2019), se han analizado las posibles interacciones de estas 3 expansinas con el resto de componentes de la pared celular, y los resultados obtenidos sugieren que las expansinas pueden unirse a diferentes componentes de la pared celular, además de la celulosa. Los autores concluyeron que cada isoforma podría estar actuando en un dominio diferente de la pared celular. Además, se ha caracterizado una expansina de *F. x ananassa* Duch. 'Camarosa' (FaEXPA5) que parece estar regulada positivamente por ABA (Valenzuela-Riffo et al., 2020).

Según todo lo expuesto, los resultados de los estudios más recientes indican que las pectinas juegan un papel clave en el desmantelamiento de la pared celular y, por tanto, en el reblandecimiento del fruto durante la maduración. Además, hay indicios suficientes como para pensar que el RG-1 juega un papel clave en el mantenimiento de la estructura de la lámina media y, por tanto, en la adhesión celular.

### **I.7 Factores de transcripción en la maduración de la fresa**

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas que se unen específicamente a determinadas secuencias de ADN, normalmente en regiones reguladoras, para modular la transcripción génica.

Los FTs suelen tener un dominio altamente conservado, por el cual se une al ADN, llamado dominio de unión, y un dominio altamente variable por el cual se une a otra proteína, llamado dominio efector o de transactivación. Este dominio efector puede unirse directamente a la ARN polimerasa, unirse a otros factores que intervienen en la activación o represión de la transcripción, o reclutar de forma directa o indirecta a histonas (Fietze y Farnham, 2011). Primero, el FT se une al ADN y después se une a otros factores o a la ARN polimerasa para poder modular la transcripción, pudiendo activarla o reprimirla, dependiendo del caso (Latchman, 1993).

Estas proteínas se clasifican en familias atendiendo a la similitud de secuencia, normalmente en el dominio de unión al ADN (Luscombe y Thornton, 2002), siendo muy numerosas (58) las familias descritas en plantas dicotiledóneas (Jinpu Jin et al., 2017). Se ha demostrado que algunos factores de transcripción se expresan específicamente durante el desarrollo del fruto, siendo muchos de ellos caracterizados en la planta de tomate, usada frecuentemente como modelo para el estudio de la maduración de frutos (Karlova et al., 2014). Destacando algunos hallazgos, el FT de la familia MADS-box RIPENING-INHIBITOR (RIN) (Vrebalov et al., 2002), los FTs COLORLESS NON-RIPENING (CNR) y SBP (Manning et al., 2006) y el producto de un gen de la familia non-ripening (*nor*) que codifica un FT de la familia NAC (Martel et al., 2011) han sido propuestos como candidatos para la activación en cascada del proceso de maduración (Karlova et al., 2014; Giovannoni et al., 2017). El bloqueo de la expresión de los genes *RIN* y *CNR* inhiben el proceso de maduración, reprimiendo la biosíntesis de etileno y la capacidad de respuesta al aplicar exógenamente a este gas, acompañado de un bloqueo del reblandecimiento y de la acumulación de carotenoides durante la maduración (Fraser et al., 2001; Vrebalov et al., 2002; Manning et al., 2006). En consonancia, aguas abajo de *RIN* y *CNR*, el gen *SIAP2a* codificante de la proteína AP2/ERF APETALA2a regula negativamente la biosíntesis y la señalización del etileno, cuyo silenciamiento provoca frutos maduros con color y contenido de carotenoides alterados y con una senescencia rápida. Además, se observó que genes codificantes de PME y expansinas estaban reprimidos, evidenciando un posible papel en el reblandecimiento del fruto durante la maduración (Chung et al., 2010; Karlova et al., 2011). El gen *SIMADS1*, codificante de un FT de la familia MADS-box, fue silenciado mediante ARNi, provocando frutos con una rápida maduración acompañado de unos niveles altos de etileno. Además, podría interactuar de forma directa con

RIN, sugiriendo que este FT podría jugar un papel clave como represor de la biosíntesis y señalización de etileno (Dong et al., 2013).

Hay pocos estudios que arrojan luz sobre el papel de los FTs en la maduración del receptáculo de fresa. Sin embargo, hay indicios de que los FTs juegan un papel importante en la regulación del desarrollo y de la maduración, como el hecho de que genes con dominio MADS-box de tipo SEPALLATA (como RIN) parecen ser reguladores globales de la maduración, con funciones conservadas también en frutos no climatéricos (Karlova et al., 2014), en concreto el gen homólogo de RIN *FaMADS9* se acumulan durante la maduración de frutos no climatéricos como la fresa (Vrebalov et al., 2002).

A pesar de que es complicado saber qué papel juega cada FT debido a que forman complejas redes de interacción en numerosos procesos (Moya-León et al., 2019) y a que la similitud de secuencias entre los FTs de una misma familia no implica que los genes regulados estén implicados en los mismos procesos (Klie et al., 2014), son varios los estudios ya realizados que muestran la implicación de diferentes FTs en diversos aspectos del proceso de la maduración de la fresa. Uno de los FTs más caracterizados es uno de la familia R2R3-MYB, en concreto el codificado por el gen *FaMYB10*, cuya expresión se localiza principalmente en el receptáculo de fresa aumentando a partir de estadio blanco. La expresión de este gen está regulada positivamente por ABA y por luz, independientemente y, está involucrado en la acumulación de pigmentos en fresa madura, siendo uno de los genes clave responsables del color rojo, ya que activa la síntesis de antocianinas a través de la ruta de los flavonoides/fenilpropanoides (Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Hawkins et al., 2016; Zhang et al., 2017). Otro gen de la familia R2R3-MYB caracterizado es *FaMYB1* que codifica a un FT que reprime la acción de *FaMYB10*, siendo un represor de la biosíntesis de antocianidina reprimiendo la expresión de la antocianidina sintasa y activando la antocianidina reductasa (Salvatierra et al., 2013; Lin-Wang et al., 2014). También se han caracterizado los genes *FaMYB9* y *FaMYB11* cuyos productos actúan junto con los FTs codificados por *FabHLLH3* y *FaTTG1* promoviendo la biosíntesis de proantocianinas que se acumulan en el estadio blanco de la fresa (Schaart et al., 2013). Wei et al. (2018) identificaron el gen *FaMYB44.2*, cuyo producto reprime la acumulación de ácido málico en la fresa madura y la expresión del gen *FaSPS3*, bloqueando también la acumulación de azúcar en el fruto durante la maduración. Sin embargo, el gen *FaGAMYB* promueve la ruta biosintética de los flavonoides aguas arriba del ABA (Vallarino et al., 2015). Así mismo, se ha caracterizado un FT de la familia DOF, codificado por el gen *FaDOF<sub>2</sub>* (Molina-Hidalgo et al., 2017), que interacciona con el FT R2R3-MYB *FaEOBII* cuya acción es necesaria para la biosíntesis de eugenol, un compuesto fenilpropanoide volátil que contribuye al aroma de la fresa (Medina-Puche et al., 2016).

También se ha caracterizado el FT homólogo a RIN en tomate, codificado por el gen de tipo MADS-box *FaMADS9*, cuya expresión es necesaria para el correcto desarrollo y maduración del fruto (Seymour et al., 2011; Vallarino et al., 2019). Un papel contrario parece ejercer el FT codificado por *FaMADS1a* cuya expresión disminuye con ABA y aumenta con auxina, provocando al expresarse la represión de genes relacionados con la síntesis de antocianinas (Lu et al., 2018). Otro gen de esta familia MADS-box caracterizado es *FaSHP*, perteneciendo al tipo c de esta familia de genes (tipo

SHATTERPROOF), cuya sobreexpresión acorta el tiempo de maduración y cuya represión provoca un alargamiento de este proceso (Daminato et al., 2013).

Otro gen que ha sido caracterizado es *FaASR*, que codifica una proteína de tipo ASR (inducida por ABA, estrés y maduración), cuya expresión aumenta durante la maduración a partir del inicio del estadio blanco y que parece promover el transporte de sacarosa y la despolimerización de la pared celular (Chen et al., 2011; Jia et al., 2016).

Se ha comprobado que hay FTs de la familia *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA*, and *PROLIFERATING4 CELL FACTORS* (TCP) que intervienen en la maduración. El gen *FaTCP11* parece regular la síntesis de flavan-3-oles, en la ruta de los flavonoides (Pillet et al., 2015) y *FvTCP9* actúa promoviendo la maduración aumentando la biosíntesis de ABA y de las antocianinas (Xie et al., 2020).

Recientemente se ha descrito otra gran familia de FTs que parece que está involucrada en la maduración del fruto de fresa, la familia NAC. Se ha comprobado que 6 FTs tipo NAC de *F. x ananassa* siguen un patrón de expresión y una regulación hormonal típica de elementos involucrados en la maduración (Moyano et al., 2018), mientras que en *F. chiloensis* se ha caracterizado *FcNAC1*, siguiendo el mismo patrón de expresión y de regulación hormonal. Además, se aportaron evidencias de que *FcNAC1* podría desempeñar un papel importante en la regulación de genes degradantes de la pared celular (Carrasco-Orellana et al., 2018).

Todo lo expuesto nos indica que hay FTs que juegan un papel clave en la regulación de la maduración del fruto, lo que hace de ellos posibles genes diana de interés biotecnológico, ya sea para alargar la vida poscosecha o para aumentar la calidad y/o producción de los frutos. Esto, junto con que muchos FTs de función desconocida, a pesar de seguir un patrón de expresión interesante durante la maduración, no se han caracterizado (Hossain et al., 2018), hace que sea interesante seguir estudiando el efecto de los factores de transcripción en la maduración de la fresa.

## **1.8 Uso de cultivos celulares para el estudio de la maduración**

La maduración de la fresa es un proceso que está regulado por factores internos (como factores de transcripción) y por factores externos (como la temperatura) (Giovannoni, 2001). Esto hace, que el estudio del metabolismo en el fruto sea complejo, ya que es complicado diferenciar si los resultados observados se deben a los tratamientos aplicados, o a las condiciones en las que se ha crecido la planta, aumentando así el número de variables. Además, el fruto de la fresa es un órgano complejo que contiene diferentes tejidos con diferentes metabolismos y que difieren en el tiempo de maduración.

Estos desafíos pueden ser evitados usando líneas celulares procedentes de diferentes tejidos. Las células vegetales son totipotentes, lo que significa que cada célula cultivada tiene toda la información genética y, por lo tanto, es capaz de producir todos los componentes que se encuentran en la planta madre. Las líneas celulares tienen un crecimiento más rápido que en el campo, y no son afectadas por condiciones

ambientales externas, como es la estacionalidad, lo que permite realizar experimentos en periodos de tiempo más cortos y durante todo el año, facilitando la planificación del trabajo (Sharathchandra et al., 2011). Nos permiten también la posibilidad de controlar de forma más precisa la mayoría de factores ambientales (luz, temperatura, nutrientes, humedad...). Esto, junto con el aislamiento individual de cada muestra, conlleva que el material no sufra ataques por parte de otros organismos, y si los sufriera, es más fácil de detectar, haciendo que los experimentos sean más precisos y reproducibles. Además, su facilidad de manipulación (ordenar, etiquetar, toma de datos...), ligado a un ahorro de espacio y una disminución de los costes (menos superficie, menos riesgo de pérdida, menos tiempo para alcanzar los objetivos), hacen que esta herramienta sea muy potente para realizar rápidas primeras aproximaciones, aunque luego sea necesario corroborar los resultados *in vivo*. También son importantes por su uso como biorreactores para producir metabolitos secundarios a gran escala (Ramachandra-Rao y Ravishankar, 2002).

Hay numerosos trabajos en la vid, donde se usan cultivos celulares para el estudio de diferentes rutas metabólicas. Los cultivos celulares han servido para: comprobar la respuesta frente a patógenos (Mutawila et al., 2017), analizar el efecto de metabolitos secundarios y de la oscuridad en la muerte celular y senescencia (Bertolini et al., 2016), comprobar el efecto de compuestos como el metil jasmonato en el metabolismo secundario (Andi et al., 2019), analizar el proteoma extracelular (Sabater-Jara et al., 2014) o estudiar los cambios en la pared celular como consecuencia de deficiencia de nutrientes (Fernandes et al., 2013).

En el caso de la fresa, también se han usado los cultivos celulares para determinados procesos, como el metabolismo del fenol y su relación con el crecimiento (Arnaldos et al., 2001; Arnaldos et al., 2002) y la síntesis de antocianinas (Mori et al., 1994; Sakurai y Mori, 1996; Zhang et al., 1998).

Sin embargo, no se han conseguido líneas celulares procedentes de diferentes estadios de maduración para ser comparados entre sí, y comprobar su validez para realizar estudios de las alteraciones producidas durante la maduración de la fresa, como puede ser la producción de antocianinas o las alteraciones provocadas en la pared celular.

Por ello, obtener y caracterizar líneas celulares procedentes de receptáculos de fresa en diferentes estadios de maduración, podría aportar un sistema rápido y reproducible para realizar estudios relacionados con la maduración de la fresa.



# Objetivos

1 - Obtener líneas transgénicas de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' con el gen *FaNAC2* silenciado, y líneas transgénicas con el gen *FaNAC3* silenciado, así como caracterizar los frutos producidos por estas líneas evaluando sus papeles en el desarrollo y en la maduración, incluyendo su función en la pared celular.

2 - Caracterizar frutos de líneas transgénicas de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' con el gen *FaRGlyase 1* silenciado, y analizar su efecto en la estructura de la pared celular y en el reblandecimiento del fruto durante la maduración.

3 - Caracterizar líneas celulares procedentes de receptáculo de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' en diferentes estadios de maduración, así como de hoja, para evaluar su uso como sistema modelo para estudiar la producción de pigmentos y la remodelación de la pared celular durante la maduración.



# **Capítulo II: Caracterización de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en frutos de *F. x ananassa* Duch. ‘Chandler’**



## Capítulo II: Caracterización de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en frutos de *F. x ananassa*

### II.1 Introducción

La fresa es un fruto blando de gran importancia económica cuya demanda por los consumidores ha ido en aumento debido a sus propiedades organolépticas y nutricionales, siendo España uno de los principales beneficiarios (Simpson, 2018).

Este fruto está considerado como un fruto no climatérico cuyo desarrollo y maduración depende principalmente de la acción coordinada de 5 fitohormonas: la auxina y las giberelinas que promueven el crecimiento y desarrollo del fruto en estadios tempranos, las citoquininas que parece que también juega un papel importante en estadios tempranos del fruto, y el ABA y el etileno que promueven la maduración del fruto (Gu et al., 2019). Durante la maduración los principales cambios que se producen son una acumulación de pigmentos que le otorgan el color rojo característico, y un reblandecimiento del fruto que le confiere una textura deseable por el consumidor (Giovannoni, 2001).

El reblandecimiento de la fresa se debe a una acción coordinada de enzimas hidrolíticas de pared celular durante la maduración, pero al ser un fruto blando este proceso se produce en poco tiempo dando lugar a un reblandecimiento excesivo tras ser cosechado, quedando inservible y provocando elevadas pérdidas económicas (Mercado et al., 2011; Paniagua et al., 2017; Posé et al., 2019). Se ha descrito que las diferentes hormonas pueden controlar la acción secuencial de las enzimas encargadas de modificar la pared celular durante el desarrollo y maduración de la fresa, pudiendo una misma hormona sobreexpresar y reprimir la acción de dos enzimas de la misma familia, complicando el entendimiento y el control de este proceso (Villarreal et al., 2010, 2016; Moya-León et al., 2019).

Ha sido reportado que los factores de transcripción (FTs) pueden modular numerosas rutas metabólicas implicadas en diferentes aspectos del proceso de desarrollo y maduración del fruto como el tamaño, la textura, el color y el aroma, pudiendo afectar también a la biosíntesis y señalización de diferentes hormonas (Salvatierra et al., 2013b; Schaart et al., 2013; Vallarino et al., 2015; Molina-Hidalgo et al., 2017; Lu et al., 2018). Algunos ejemplos de FTs cuyo papel en la maduración de la fresa ha sido demostrado son *FaMYB10*, ejerciendo un papel clave en la biosíntesis de antocianinas por la vía de fenilpropanoides/flavonoides (Salvatierra et al., 2013; Schaart et al., 2013; Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Vallarino et al., 2015; Zhang et al., 2017; Hua Wang et al., 2019), *FaEOBII* junto a *FaDOF<sub>2</sub>* en la producción de eugenol durante la maduración (Medina-Puche et al., 2016; Molina-Hidalgo et al., 2017) y *FaMYB44.2* como regulador negativo de la acumulación de ácido málico y de azúcar (Wei et al., 2018).

La familia de FTs tipo NAC (NAM, ATAF1/2 and CUC2) son un amplio grupo de proteínas específicas de plantas que tienen un dominio NAC de unión al ADN conservado de aproximadamente 150 aminoácidos en el extremo N-terminal y una

región más variable en el extremo C-terminal (Ernst et al., 2004). Esta región variable en el extremo C-terminal, se denomina región reguladora de la transcripción (TR), y parece ser la región que activa y/o reprime la transcripción (Ooka et al., 2003). El dominio NAC, cuya función es la de unión a regiones reguladoras de expresión del ADN y/o proteínas (Jensen et al., 2010), contiene cinco subdominios (A – E), siendo los subdominios C y D altamente conservados, con cargas positivas netas, los que se unen a regiones cis específicas reguladoras, mientras que la función del subdominio A es la de mantener la dimerización del factor de transcripción (Ernst et al., 2004; Chen et al., 2011). Los subdominios B y E pueden ser responsables de aumentar la diversidad funcional debido a su estructura más variable (Xie et al., 2002; Puranik et al., 2012). La variabilidad de la región C-terminal y de los subdominios B y E, hacen que la familia de proteínas NAC esté involucrada en numerosos procesos. Se ha documentado la implicación de FTs NAC en procesos como estrés abiótico por sequía, congelación o salinidad (Shao et al., 2015), formación de raíces (He et al., 2005), floración (Sablowski y Meyerowitz, 1998), senescencia (Kim et al., 2016) o defensa frente a patógenos (Xiao'e Wang et al., 2009; Nuruzzaman et al., 2013; Yuan et al., 2019).

También se ha descrito que hay FTs NAC que intervienen en el proceso de maduración, tanto de frutos climatéricos como no climatéricos. 2 genes NAC aislados del fruto de banana (*MaNAC1* y *MaNAC2*) parecen estar involucrados en la maduración del fruto, favoreciéndola, interaccionando con una proteína represora de la vía de señalización del etileno homóloga a EIN3 (Shan et al., 2012, 2020). En el fruto de melocotón se ha comprobado que el heterodímero formado por dos FTs NAC (BL-PpNAC1) promueve la biosíntesis de antocianinas mediante la activación de *PpMYB10* (Zhou et al., 2015). En especies de melón cuyo comportamiento de maduración se asemeja al del modelo climatérico una represión del gen *CmNAC-NOR*, similar al del tomate, provocó un retraso de la maduración junto con una reducción de la biosíntesis de etileno, mientras que en especies cuya maduración parece ser no climatérica causó la recuperación del climaterio (Ríos et al., 2017). En papaya se ha documentado que hay 2 FTs NAC que promueven la biosíntesis de carotenoides, CpNAC1 que promueve la transcripción de genes fitoeno desaturasas, y CpNAC2 al que parece que se le une CpEIN3a para activar un subconjunto de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides (Fu et al., 2016, 2017). En el fruto de kiwi la aplicación exógena de metil jasmonato y etileno indujo la biosíntesis de etileno sugiriéndose estar mediada por la acción de AdNAC2 y AdNAC3 (Wu et al., 2020). En el fruto de manzana se ha comprobado que el FT MdNAC42 promueve la biosíntesis de antocianinas por la vía de los fenilpropanoides interaccionando con MdMYB10 (Shuangyi Zhang et al., 2020). En tomate se ha descrito que la expresión de *SINAC1* provoca una reducción en la acumulación de etileno, disminuyendo también la acumulación de carotenoides y retrasando la maduración, y un aumento en los niveles de ABA acompañado de un reblandecimiento excesivo (Ma et al., 2014; Meng et al., 2016). Sin embargo, la expresión del gen *SINAC4* parece promover la maduración de tomate, ya que el silenciamiento provocó un retraso de la maduración mediante una reducción de la síntesis de etileno acompañada de una reducción en la acumulación de carotenoides (Zhu et al., 2014; Rufang Wang et al., 2019). Otros dos 2 genes que parecen promover la maduración en tomate son *SINAC48* y *SINAC19*, que actuarían aguas arriba de los genes encargados de la biosíntesis de etileno (Kou et al., 2016).

Además, la represión de otros dos genes tipo NAC, *NAC-NOR* y *NAC-NOR-like1*, provocan un retraso en la maduración afectando a genes relacionados con la producción de antocianinas (Gao et al., 2018, 2020). En el fruto de lichi, considerado como no climatérico, se ha descrito que *LcNAC1* actúa de forma antagónica al FT *LcWRKY1* retrasando la senescencia mediante la acción de *LcAOX1a*, proteína que evita la acumulación de moléculas oxidantes durante la senescencia del fruto (Jiang et al., 2017). Además, en esta especie parece que la biosíntesis de antocianinas durante la maduración es controlada por la acción antagónica de *LcNAC13* y *LcMYB1*, siendo *LcNAC13* un regulador negativo (Jiang et al., 2019). En el fruto de la mandarina, también considerado como no climatérico, se ha documentado que *CrNAC036* puede unirse a *CrMYB68* sugiriendo una represión sinérgica de la biosíntesis de ABA inhibiendo la expresión de *CrNCED5* (Zhu et al., 2020).

En fresa son muy pocos los estudios realizados con esta familia de FTs. Carrasco-Orellana et al. (2018) caracterizaron el gen *FcNAC1*, que codifica un factor de transcripción localizado en el núcleo, inducido por ABA y reprimido por auxina, el cual está involucrado en la maduración del fruto afectando a la expresión de enzimas modificadoras de las pared celular, al desarrollo del color y a la formación de componentes del aroma. En el trabajo de Moyano et al. (2018), se identificaron 112 genes codificantes de FTs tipo NAC, de los cuales *FaNAC006*, *FaNAC021*, *FaNAC022*, *FaNAC035*, *FaNAC042* y *FaNAC092* se expresaban durante el desarrollo y la maduración del receptáculo de fresa, aumentando su expresión conforme avanzaba este proceso, sugiriendo un posible papel en la maduración. Además, comprobaron que todos, a excepción de *FaNAC092*, eran inducidos por ABA, otra prueba que sugiere un posible papel en la maduración de fresa de estos 5 FTs de tipo NAC.

En este trabajo se han seleccionado los genes *FaNAC035*, cuya expresión es específica de fruto y, por tanto, podría estar regulando un proceso específico de la maduración, y *FaNAC042* con similitud de secuencia con otros FT NAC en planta que sugieren que podría estar implicado en la determinación de la textura y firmeza del fruto (Moyano et al., 2018), con el fin de determinar el papel específico que tienen en la maduración del fruto de fresa. Para ello, se pretende conseguir líneas transgénicas de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' con los genes *FaNAC035* (FvH4\_3g20700.1 en la versión 4.0.a1 del genoma de *F. vesca*, en la base de datos de rosáceas), nombrado en esta tesis como *FaNAC2*, y de *FaNAC042* (FvH4\_4g23130.1 en la versión 4.0.a1 del genoma de *F. vesca*, en la base de datos de rosáceas), nombrado como *FaNAC3*, silenciados mediante ARNi (usando *Agrobacterium tumefaciens* como vector). Además, se acometerá el análisis funcional y transcriptómico de los frutos producidos por las líneas anteriores.



## II.2 Materiales y métodos

### II.2.1 Generación de líneas de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' con los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados por ARNi

#### II.2.1.1 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa bacteriana usada fue AGL1 (Lazo et al., 1991), cuyo agente de selección es el antibiótico rifampicina. A partir de una colonia aislada de células de *A. tumefaciens*, se creció en 5 mL LB suplementado con rifampicina 10 mg/L e incubadas a 28 °C en agitación suave durante toda la noche un precultivo de células con mayor potencial de crecimiento. De este precultivo se cultivó un inóculo de 100 µL en un matraz con 50 mL de LB en las mismas condiciones hasta que la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) alcanzó un valor entre 0,5 y 0,6, asegurándonos una cantidad suficiente de bacterias en fase exponencial. Este cultivo se centrifugó dos veces a 4 °C en tubos Falcon de 50 mL a 3500 rpm durante 10 min, desechando en ambos casos el sobrenadante y resuspendiendo el pellet primero en 10 mL de NaCl 0,15 M frío y, después, en 1 mL de  $CaCl_2$  20 mM frío. Por último, con este volumen se hicieron alícuotas de 200 µL en tubos de 1,5 mL tipo eppendorf. A las células competentes no utilizadas en el momento para su transformación se le añadieron 200 µL de glicerol al 30% y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para evitar dañarlas. Tras esto, los tubos se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

#### II.2.1.2 Transformación genética de *A. tumefaciens* mediante choque térmico

Los plásmidos utilizados en la transformación (pFRN-FaNAC2 y pFRN-FaNAC3) fueron cedidos por el grupo liderado por el Dr. Juan Muñoz del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y corresponde a las construcciones ARNi realizadas en el plásmido pFRN de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* de *Fragaria x ananassa* para su posterior silenciamiento en plantas de fresa. La expresión de dicho plásmido está dirigida por el promotor 35S CaMV, asegurando una fuerte expresión en plantas.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se añadió entre 0,5 y 1 µg del ADN plasmídico de las construcciones de interés a las células competentes, homogenizándose todo por inversión varias veces y se incubó en hielo durante 30 min. Tras la incubación las células se congelaron en nitrógeno líquido durante 1 min y, acto seguido, el tubo se introdujo rápidamente en un baño a 37 °C para provocar el choque térmico necesario en la transformación, manteniéndolo en el baño durante 5 min. Pasada la incubación, las bacterias fueron crecidas en 1 mL de medio LB durante 3 horas a 28 °C con agitación suave. De este cultivo se tomaron 100 µL para ser sembrado en placas con medio LB y 1,5 % agar, suplementado con rifampicina (10 mg/L) y kanamicina (25 mg/L). El resto del cultivo del tubo fue concentrado por centrifugación durante 1 min a 3500 rpm para ser cultivado en placas con medio LB idénticas a las anteriores, con el fin de obtener un cultivo más concentrado. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 horas, creciendo sólo colonias de bacterias transformadas genéticamente.

### II.2.1.3 Transformación genética de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' mediante *A. tumefaciens*

La transformación se realizó a partir de 200 explantos cortados de hojas de fresa por cada construcción génica, con un tamaño aproximado de 4 x 4 mm, sin incluir bordes de la hoja, procedente de plantas *in vitro*. Estos explantos se distribuyeron en placas con 25 mL de medio N<sub>30</sub>K suplementado con IBA 8,88 µM y BA 2,46 µM, a razón de 15 explantos por placa, colocándolos de forma uniforme a lo largo de la placa y con el envés hacia arriba para ser incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 8 días. Tras este tiempo, se realizó la infección de los explantos con *A. tumefaciens*. Para ello, se crecieron las cepas AGL1 transformadas con las dos construcciones a 28 °C durante 48 horas en tubos de vidrio con 5mL de medio LB líquido a pH 7 suplementado con los antibióticos de selección correspondientes, rifampicina (10 mg/L) para seleccionar la cepa AGL1 y kanamicina (25 mg/L) para seleccionar nuestro plásmido. De este cultivo se inocularon 2,5 mL en 25 mL de medio LB líquido pH 5 suplementado con los antibióticos de selección y 25 µL de acetosiringona 50 mM. Pasadas 24 horas de incubación a 28 °C el cultivo presentará una DO<sub>600</sub> entre 1,5 y 2. En este punto, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min dos veces el cultivo, desechando en ambos casos el sobrenadante y resuspendiendo el pellet primero con 10 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y posteriormente con 165 mL de N<sub>30</sub>K líquido (sin hormonas) para ser repartido en tubos tipo Falcons de 50 mL (a razón de 40 mL de cultivo por tubo, un total de 4 tubos por construcción). Se infectaron 50 explantos por cada tubo, manteniéndolos 15 min a temperatura ambiente en un agitador orbital. Tras la incubación, los explantos se secaron en papel de filtro previamente esterilizado, y se volvieron a pasar a las placas con medio N<sub>30</sub>K dónde teníamos previamente los explantos para ser incubados durante 48 horas en oscuridad. Una vez pasado este tiempo, los explantos se colocaron en placas con medio N<sub>30</sub>K suplementado de IBA, BA, kanamicina y timentina (250 mg/L), a razón de 10 explantos por placa para ser incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 72 horas. Tras este tiempo, las placas se mantuvieron en un ciclo de 16 horas de luz al día.

### II.2.1.4 Regeneración y multiplicación de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler'

El medio donde se encontraban los explantos infectados por *Agrobacterium* se renovó cada 2 semanas. Tras 3-4 meses, al no haber contaminación por *Agrobacterium* se redujo a la mitad la cantidad de timentina (125 mg/L) y comenzó a apreciarse callo en los explantos, que posteriormente daría lugar a los primeros tallos. Cuando estos tallos alcanzaban 2-3 cm de altura se pasaron a tubos de vidrio con medio de multiplicación, N<sub>30</sub>K suplementado con kinetina (0,47 mg/L), kanamicina (25 mg/L) y timentina (125 mg/L). A estas plántulas se les renovó el medio cada 8 semanas, cortando la raíz y saneando la parte aérea, hasta que cada plántula originó al menos 6 copias. Si durante este proceso se apreciaba contaminación por *A. tumefaciens* en placas o en tubos, se lavaba el material con agua destilada estéril y timentina, se secaba y se volvía a cultivar en un medio libre de contaminación.

### II.2.1.5 Aclimatación

Una copia de cada línea transgénica fue pasada a condiciones *ex vitro* en condiciones de humedad, temperatura ( $25 \pm 2$  °C) y luz controladas (fotoperiodo de 16 h a  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Primero se plantaron en alveolos con abundante agua cubiertos de film transparente para conseguir una humedad cercana al 100%. Al cabo de 5 días aproximadamente se comenzó a agujerear la cubierta, para que las plantas fueran adaptándose progresivamente a niveles de humedad de invernadero. De esta forma, al cabo de dos semanas las plantas estaban totalmente expuestas. En este punto, las plantas se trasplantaron a macetas, ya en invernadero, en condiciones semicontroladas, refrigerándose a partir de los 22 °C.

### II.2.1.6 Multiplicación por estolones

Una vez en el invernadero, cuando las plantas produjeron estolones, estos son plantados en nuevas macetas con el fin de obtener al menos 5 copias en invernadero de cada línea transgénicas. Las plantas formadas por dichos estolones no produjeron frutos al menos hasta la primavera siguiente.

## **II.2.2 Análisis del fenotipo de los frutos obtenidos de las líneas con *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados**

Las plantas transgénicas fueron analizadas durante dos cosechas consecutivas, usando plantas no transgénicas de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' como control. Las plantas se cultivaron en un invernadero a temperatura y luz naturales, recolectando los frutos entre marzo y julio. Durante el primer año 5 líneas de *FaNAC2* (2, 7, 11, 12 y 17) y 3 líneas de *FaNAC3* (2, 3 y 10) dieron frutos, aunque como era de esperar el número fue muy reducido. Durante el segundo año, fueron 7 las líneas de *FaNAC2* que produjeron frutos (se sumaron las líneas 10 y 19) y 5 de *FaNAC3* (se sumaron las líneas 7 y 12). En esta cosecha ya hubo líneas que dieron más de 15 frutos, lo que permitía un análisis más robusto.

Los frutos fueron cosechados en estadio rojo maduro. Se registró el peso, tamaño, color, sólidos solubles y firmeza de dichos frutos. Se midió el color utilizando un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japón). El instrumento fue calibrado con un blanco estándar antes de su uso, para registrar los parámetros de espacio de color CIELAB y CIELCh. Los sólidos solubles se midieron usando un refractómetro (Atago N1) y la firmeza utilizando un penetrómetro manual (Effegi) con una aguja cilíndrica de  $9.62 \text{ mm}^2$  de área. Para el peso se usó una balanza con precisión al mg, y para el tamaño se usó un calibre de precisión.

Además, se marcaron con etiquetas al menos 10 flores en antesis de las líneas *FaNAC2* 11, *FaNAC2* 12, *FaNAC3* 3 y *FaNAC3* 10 para hacer un seguimiento del desarrollo y de la maduración del fruto. En paralelo, en los mismos días, se marcaron flores en antesis de la línea control no transformada que sirvieron como referencia de desarrollo y maduración.

## II.2.3 Análisis expresión génica en frutos con el gen *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados

### II.2.3.1 Preparación del material

Los receptáculos en estadio rojo de maduración de las líneas transgénicas y del control fueron congelados con nitrógeno líquido (tomando todas las medidas de seguridad para su manipulación: guantes aislantes del frío y gafas de seguridad) y almacenados a -40 °C. A estos receptáculos congelados se le quitaron los aquenios con la ayuda de un bisturí, y con la precaución de que no se descongelaran los receptáculos en el proceso con la ayuda de nitrógeno líquido. Una vez eliminados los aquenios, se hizo una réplica biológica mezclando 4 receptáculos de cada línea, machacándolos con un mortero y homogenizando el polvo resultante. En este proceso también se cuidó que no se perdiera la cadena de frío usando nitrógeno líquido. El material procesado y congelado fue almacenado a -40 °C hasta su uso.

### II.2.3.2 Extracción ARN

La extracción de ARN de los receptáculos maduros se realizó siguiendo el protocolo de Gambino et al. (2008) con algunas modificaciones. Se usaron 300 mg del material procesado y congelado para cada extracción. Dicha extracción se realizó en tubos tipo eppendorf a los que se les añadió un volumen de 900 µL de tampón de extracción (Tabla 2.1), previamente precalentado a 65 °C y mezclado con 18 µL de β-mercaptoetanol. Tras una agitación fuerte mediante un agitador tipo vórtex se introdujo en un baño termostático a 65 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se homogenizó con un agitador tipo vórtex. Para separar las fases, las muestras se centrifugaron a 11000 g durante 10 min a 4 °C, pasándose el sobrenadante a otro tubo. El paso con cloroformo:alcohol isoamílico se repitió una vez más, juntándose los dos sobrenadantes para añadirles 280 µL de LiCl 9 M que, tras una agitación con un mezclador de vórtice, se centrifugó a 21000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en 500 µL de tampón SSTE previamente calentado a 65 °C (Tabla 2.1). Tras mezclarlo con un agitador tipo vórtex, se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, de nuevo agitación y centrifugación a 11000 g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se mezcló por agitación en mezclador de vórtice con 350 µL de isopropanol frío, para a continuación centrifugar la mezcla a 21000 g a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con etanol 75 % primero, y después con etanol 100 %. Para cada lavado se resuspendió el pellet, luego se centrifugó a 4 °C a 14000 g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. En el último lavado, para secar, tras desechar el sobrenadante se dejó en cabina de flujo laminar hasta la completa evaporación del etanol 100 %. Cuando el pellet estaba totalmente seco, se resuspendió en 30 µL de agua libre de enzimas hidrolíticas del ARN (ARNasas). Finalmente, se cuantificó la concentración de ARN usando NanoDrop one (Thermo Scientific), y se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa 1 % (descrito en apartado II.2.3.9).

Tabla 2.1: Formulación del tampón de extracción y del tampón SSTE usados para la extracción de ARN.

Tampón de extracción	Tampón SSTE
CTAB 2 % (p/v) PVP 40 2,5 % (p/v) NaCl 2 M Tris-HCl 100 mM pH 8 EDTA-Na <sub>2</sub> 25 mM pH 8	Tris-HCl 10 mM pH 8 EDTA-Na <sub>2</sub> 1 mM pH 8 SDS 0,5 % (p/v) NaCl 1 M

### II.2.3.3 Tratamiento con *DNasa*

Con el fin de eliminar las posibles contaminaciones de ADN, ya que en los siguientes pasos podría interferir en la medición de los niveles de expresión, el ARN extraído fue tratado con *DNasa* I recombinante de la casa comercial Roche (referencia 4716728001). Por cada µg de ARN se usó 1 unidad de *DNasa* I y se ajustó el tampón suministrado junto con la *DNasa* I a 1x. Dicha mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Tras la incubación se le añadieron 2 µL de EDTA 0,5 M para detener la reacción.

### II.2.3.4 Purificación de ARN

Tras el tratamiento con *DNasa* I se purificó el ARN con fenol:cloroformo (1:1 v:v) y agua, sucesivamente. Tras centrifugar a 13400 rpm durante 5 min, la fase acuosa de ambos lavados se unieron y se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de alcohol 100 % a -80 °C durante 1 hora. Tras centrifugar durante 1 hora a 13400 rpm se desechó el sobrenadante, y el pellet se lavó con etanol 70 % y 100 %, sucesivamente. Una vez descartado el etanol, y seco el pellet, este se resuspendió en 22 µL de agua libre de ARNasas.

Para la comprobación de que no hubiera restos de ADN se realizó una PCR utilizando los cebadores del gen *NDR1* como se describe en el apartado II.2.3.8.

### II.2.3.5 Retrotranscripción

A partir de 1 µg de ARN se realizó la síntesis de ADNc de cada una de las muestras, usando *iScript cDNA Synthesis Kit* de Bio-Rad (referencia 1708890). Se le añadió a cada reacción, 4 µL de buffer 5x *iScript Reaction Mix*, 1 µL *iScript Reverse Transcriptase* y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 µL. Usando el termociclador *Eppendorf Mastercycler personal*, se sometió la reacción a sucesivas incubaciones, siendo la primera a 25 °C durante 5 min, la segunda a 46 °C durante 20 min y la tercera a 95 °C durante 1 min. Tras esta última incubación las reacciones se mantuvieron a 4 °C hasta su recogida del termociclador.

### II.2.3.6 Reacción de amplificación por PCR a tiempo real a partir de ADNc

Los ADNc sintetizados previamente se usaron como molde de una PCR a tiempo real con el fin de cuantificar los niveles de expresión de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en los frutos silenciados por ARNi. Esta PCR se realizó en un *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* con capacidad para amplificar placas de 96 reacciones independientes. Para esta PCR se usó *SsoAdvanced TM SYBR® Green SuperMix* (Bio-Rad, referencia 1725270). Por cada pocillo se pusieron en la mezcla 2 µL de cada uno de los cebadores correspondientes a cada gen (Fw 2 µM y Rv 2 µM), 5 µL de supermix y 1 µL de ADNc. Se puso al menos un triplicado de cada muestra por placa. Los valores de Ct se normalizaron utilizando el Ct correspondiente al gen *NDR1* de fresa, que fue seleccionado como gen de control debido a su expresión constitutiva en todas las diferentes condiciones experimentales probadas. Con esto se determinaron los valores de expresión relativa de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados en los frutos transgénicos con respecto a los frutos control siguiendo el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (los cebadores usados se encuentran en la Tabla Suplementaria 2.1). En general, en todas las amplificaciones realizadas se empleó el mismo programa que el descrito en la tabla 2.2 (apartado II.2.3.8) para la polimerasa de Canvax.

### II.2.3.7 Análisis transcriptómico

La calidad del ARN extraído de los frutos maduros de las líneas seleccionadas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3, junto con la de la línea control, se caracterizó en un Bioanalyzer asegurando que la integridad del ARN de las muestras presentaba un  $Rin > 8$ . Las muestras de ARN seleccionadas fueron enviadas, congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y protegidas con suficiente nieve carbónica, a la empresa Novogene (Novogene Corporation, Beijing, China) donde se realizó la secuenciación usando la tecnología Illumina HiSeq 2500/3000, asegurando al menos 40 millones de lecturas por muestra. El análisis bioinformático descrito en este apartado también fue realizado por Novogene, pero, no obstante, dicho análisis fue revisado e interpretado por mí.

Se obtuvo el parámetro Phred o Q de cada réplica, este parámetro es un indicador de calidad de la secuenciación ya que está relacionada logarítmicamente con las probabilidades de error de las llamadas de base (P) ( $Q = -10\log_{10}P$ ), mediante el programa informático CASAVA v1.8 de Illumina. También se calculó el porcentaje de de guanina y citosina (GC) del total de las bases, y se estimó su distribución durante la secuenciación. A continuación, las lecturas obtenidas se filtraron eliminando lecturas con adaptadores, lecturas con más de un 10 % de indeterminaciones y lecturas de baja calidad. Con las lecturas filtradas se hizo un cartografiado de los fragmentos en el genoma de *Fragaria vesca* v4.0.a1 (Edger et al., 2017) usando el programa Tophat2.

El nivel de expresión del gen se estimó por la abundancia de la transcripción. Cuanto mayor es la abundancia, mayor es el nivel de expresión génica. En nuestro análisis de secuenciación de ARN, el nivel de expresión génica se estimó contando las lecturas asignadas a genes o exones. Para contabilizar el número de lecturas asignadas en cada gen se usó el programa HTSeq v0.6.1. Pero el recuento de lecturas no solo es proporcional al nivel de expresión real del gen, también es proporcional a la longitud

del gen y la profundidad de secuenciación. Para hacer que el nivel de expresión génica estimado en diferentes genes y experimentos fuera comparable, se aplicó el método FPKM (Fragmentos Por Kilobase de secuencia de transcripción por Millón), ya que este método es usado para estimar los niveles de expresión génica teniendo en cuenta los efectos tanto de la profundidad de secuenciación como de la longitud del gen al contar fragmentos (Trapnell et al., 2010). Por lo tanto, la expresión génica calculada pudo usarse directamente para comparar la diferencia de expresión génica entre muestras.

La expresión génica en las muestras de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3 con respecto a las muestras de la línea control se comparó utilizando el paquete de R DESeq (1.18.0). Los valores P resultantes se ajustaron utilizando el enfoque de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de falso descubrimiento (FDR). Los genes con un valor de P ajustado < 0,05 tras DESeq fueron anotados como diferencialmente expresados (Anders y Huber, 2010). De estos genes diferencialmente expresados se tuvieron en cuenta los que presentaron un log<sub>2</sub> fold change de ± 1,5.

Por último, se comprobó la correlación entre réplicas, para comprobar la confiabilidad del experimento, calculando el coeficiente de Pearson (R<sup>2</sup>) con los genes diferencialmente expresados.

### II.2.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se usó para clonar los genes en diferentes plásmidos, tanto para obtener el producto con el que hacer la clonación como para después hacer las comprobaciones correspondientes, para la comprobación de la ausencia de ADN tras tratar las muestras de ARN con *DNAse* I (apartado II.2.3.4), y para amplificar colonias de levadura. Para las clonaciones se usó la *iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase* de Bio-Rad (referencia 1725330), y para las PCRs de rutina se usó la *Horse-Power™ Taq DNA Polymerase* de Canvax (referencia P0025). Para cada reacción se usaron las condiciones indicadas en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Componentes (izquierda) y condiciones (derecha) usados para cada reacción dependiendo de la enzima polimerasa usada, alta fidelidad (arriba) o rutinaria (abajo).

Polimerasa de alta fidelidad de Bio-Rad	
Tampón de PCR con MgCl <sub>2</sub> – 4 µL	95 °C – 30 s
dNTP 5 mM – 0,8 µL	95 °C – 6 s
Oligo Fw 2 µM – 5 µL	T <sup>a</sup> anillamiento (normalmente cerca 56 °C) –
Oligo Rv 2 µM – 5 µL	20 s
ADNc – 2 µL	72 °C – 30 s por Kb
Taq 5 U/µL – 0,2 µL	35 ciclos de repetición desde el paso 2 al 4
Agua – 3 µL	72 °C – 420 s
	8 °C – hasta que se recoja la muestra

Polimerasa rutinaria de Canvax	
Tampón de PCR 10X con MgCl <sub>2</sub> – 2,5 µL	95 °C – 120 s
dNTP 5 mM – 1µL	95 °C – 30 s
Oligo Fw 2 µM – 2,5 µL	T <sup>a</sup> anillamiento (normalmente cerca 56 °C) – 30 s
Oligo Rv 2 µM – 2,5 µL	72 °C – 60 s por Kb
ADNc – 2 µL	35 ciclos de repetición desde el paso 2 al 4
Taq 1 U/µL – 1µL	72 °C – 120 s
Agua – 10 µL	8 °C – hasta que se recoja la muestra

### II.2.3.9 Electroforesis gel de agarosa

Se usaron geles horizontales al 1 % p/v de agarosa en TBE 1X (Tabla 2.3) para separar productos de PCR y comprobar la integridad del ARN. Como intercalante de nucleótidos fluorescente se usó SYBR™ Safe™ de la casa comercial Invitrogen (referencia S33102) a 1X. Las muestras se cargaron en el gel mezcladas con tampón de carga 10X (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: formulación de tampón TBE 1X y del tampón de carga 10X.

TBE 1X	Tampón de carga 10X
Tris 44 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 90 mM EDTA-Na <sub>2</sub> 22,2 mM Ajustar pH 8	Glicerol 50 % Azul de bromofenol 0,25 % (p/v) Xilen-cianol 0,25 % (p/v)

Los geles se sometieron a un campo eléctrico generado mediante corriente continua de un voltaje aproximado de 90 V, siendo el tiempo de separación inversamente proporcional al voltaje usado, y variable dependiendo del tamaño de las muestras.

Para la inspección de geles se usó el visulaizador *Gel Doc XR* de Bio-Rad, y se controló con el software *Image Lab 4.0*, sometiendo las muestras a luz UV (302 nm) y fotografiando posteriormente la fluorescencia emitida.

En el caso de muestra de ARN, la cubeta de electroforesis se limpió previamente con NaOH 50 mM durante al menos 3 horas. Además, todo el material usado que entró en contacto con el ARN fue previamente limpiado con etanol 70 %. Se consideró que el ARN estaba íntegro cuando al observar las dos bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S, la banda de la subunidad 28S era al menos dos veces más intensa que la de la subunidad 18S.

### II.2.3.10 Purificación de fragmentos de ADN amplificados por PCR

Cuando se necesitaba un ADN purificado, para su secuenciación o para clonar, se usó el kit *QIAquick*® *PCR Purification* (Qiagen, referencia 28104). Para proceder se siguieron las instrucciones que contenía dicho kit.

## **II.2.4 Clonación y subclonación de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3***

### II.2.4.1 Diseño de cebadores

Para la clonación de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* mediante el sistema Gateway en el vector pDONR<sup>TM</sup>221 se diseñaron cebadores que permitieran obtener el gen completo amplificado, jugando con la longitud de los cebadores e intentando que tuvieran temperaturas de anillamiento en torno a 56 °C. Una vez seleccionados los cebadores se le añadieron las colas específicas *attB* para que pudiera recombinar nuestro gen amplificado en el vector pDONR<sup>TM</sup>221 y mantuviera el marco de lectura abierto (en negrita se ha marcado la secuencia necesaria para la recombinación específica, subrayado los nucleótidos que se añadieron para mantener el marco de lectura abierto y en rojo el codón de parada):

*FaNAC2* con codón de parada:

Fw 5' **GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC** ATG GAG AGC ACC GAC TCG 3'

Rv 5' **GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC** CTA AGA ATA CCA ATT CCC CG 3'

*FaNAC3* con codón de parada:

Fw 5' **GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC** ATG GAG AAG CTT AGT TTT GTG 3'

Rv 5' **GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC** TCA CTG TTT TCT TCT AAA ATA AG 3'

También se diseñaron cebadores que no incluían el codón de parada:

*FaNAC2*:

Rv 5' **GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC** AGA ATA CCA ATT CCC CGG A 3'

*FaNAC3*:

Rv 5' **GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC** CTG TTT TCT TCT AAA ATA AGA AAG 3'

### II.2.4.2 Clonación en el plásmido pDONR<sup>TM</sup> 221

Para la clonación de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en el plásmido pDONR<sup>TM</sup> 221 (Figura 2.1) se amplificó el ADNc completo de cada gen utilizando los cebadores del apartado anterior y siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.2.3.8. Los productos amplificados contienen los sitios *attB1* y *attB2* que permite la recombinación con el vector pDONR<sup>TM</sup> 221 que posee las secuencias *attP1* y *attP2*. El vector contiene también las secuencias de los cebadores universales M13, que permite la secuenciación del fragmento clonado para su comprobación (Figura Suplementaria 2.1). Además, tiene el gen que concede resistencia al antibiótico kanamicina para seleccionar bacterias que contengan este plásmido. En la región donde se inserta nuestro gen contiene un gen *ccdB* unido a un gen *Cm<sup>R</sup>*. El gen *ccdB* interfiere con la

ADN girasa de *E. coli* inhibiendo el crecimiento de la mayoría de cepas comerciales (Bernard y Couturier, 1992) y el gen *Cm<sup>R</sup>* confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol, de esta forma cuando se inserta nuestro gen pueden proliferar las bacterias y pierden la resistencia a cloranfenicol.

Para la recombinación entre el fragmento amplificado y este plásmido, se utilizó la enzima *Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix* (Invitrogen™ referencia 11789020). Para cada reacción se usaron 3  $\mu$ L (50 ng/ $\mu$ L) de plásmido pDONR™ 221, 120 ng de producto de PCR (normalmente 2  $\mu$ L), 2  $\mu$ L de la enzima BP Clonase™ II y 3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se incubó a 25 °C durante toda la noche.

Tras la incubación se añadieron 2  $\mu$ L de proteinasa K (procedente del kit), y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Con este paso, se neutralizaron las enzimas recombinantes.

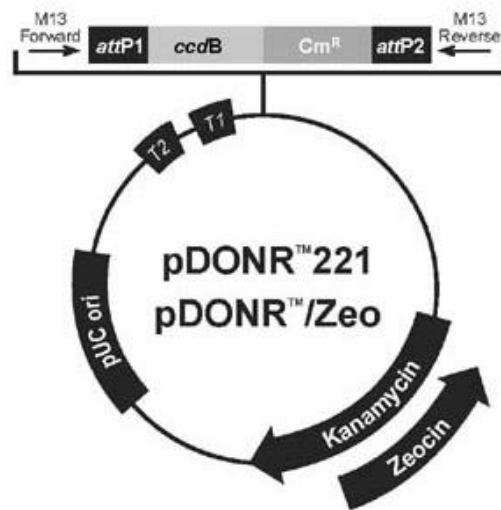


Figura 2.1: Esquema del plásmido pDONR™ 221 donde entre otras cosas se visualizan las colas específicas para la recombinación *attP1* y *attP2*; regiones flanqueantes M13 para realizar PCR de comprobación y el gen de selección que confiere resistencia a la kanamicina. Si nuestro gen es recombinado correctamente los genes *ccdB* y *CmR* (Extraído de [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fgateway\\_clonaseii\\_man.pdf&title=R2F0ZXdheSBUZWNobm9sb2d5IHdpdGggQ2xvbmFzZSBJSQ](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fgateway_clonaseii_man.pdf&title=R2F0ZXdheSBUZWNobm9sb2d5IHdpdGggQ2xvbmFzZSBJSQ)).

#### II.2.4.3 Transformación de *Escherichia coli*

Tras neutralizar la enzima BP Clonase™ II, se añadieron 7  $\mu$ L de cada reacción a un vial de células de *E. coli* competentes de la cepa TOP10 (ThermoFisher scientific) para transformarlas por choque térmico. El procedimiento que se siguió fue el suministrado por dicha casa comercial, en el que primero se realiza agitación suave de la mezcla e

incubación en hielo durante 30 min, y después se deja durante 30 segundos a 42 °C para volver a incubarla en hielo durante 2 minutos. Tras estos pasos se le añadieron 250 µL de medio de cultivo SOC (suministrado junto con las bacterias competentes por ThermoFisher scientific) y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación a 225 rpm. Una vez finalizada la incubación, se sembraron 40 µL en una placa de LB sólido suplementado con kanamicina (50 µg/mL). El cultivo restante, por centrifugación y desechado por decantación del sobrenadante fue sembrado a una concentración mayor en otra placa con la misma composición que la anterior. Ambas placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche. Todo este proceso fue realizado en cabinas de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad.

Una vez crecida las colonias de bacterias transformadas, se seleccionaron varias colonias para hacer una comprobación por PCR de que la longitud del inserto era correcta. En caso de que fuese correcta, se procedió a mandar dichos productos de PCR a secuenciar por el método Sanger a un servicio de secuenciación externo (Stab Vida). En caso de que la secuencia estuviera correcta, se guardaron varias alícuotas de esas colonias crecidas en medio LB líquido y glicerol al 15 % congeladas, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado II.2.1.1.

#### II.2.4.4 Obtención y purificación de ADN plasmídico

Para obtener el plásmido con nuestro inserto procedente de bacterias, se usó el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen, referencia 27106). Se siguieron los pasos indicados en el protocolo suministrado con dicho kit. Tras la extracción del plásmido se cuantificó la concentración en *NanoDrop One* (Thermo Scientific).

#### II.2.4.5 Subclonación a otros plásmidos

El sistema Gateway permite transferir el inserto desde el pDONR221<sup>TM</sup> a otros plásmidos de forma rápida por recombinación específica de los sitios *attP1* y *attP2*, anteriormente mencionadas en el pDONR<sup>TM</sup> 221 (Figura 2.1), y los sitios *attR1* y *attR2* colindantes al sitio de inserción de los vectores de destino (Figura 2.2). En este trabajo se han utilizado los plásmidos pDEST<sup>TM</sup> 32 y pK7FWG2.0 (Karimi et al., 2002) siguiendo en ambos casos, el mismo procedimiento descrito en el kit *Gateway<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme mix* (Invitrogen<sup>TM</sup>, referencia 11791020). Para cada reacción se añadió 150 ng de pDONR221<sup>TM</sup> con el inserto que queremos transferir (vector de origen), 150 ng de pDEST<sup>TM</sup> 32 ó pK7FWG2.0 (vector de destino), H<sub>2</sub>O (se añadió hasta completar 8 µL de volumen) y 2 µL de LR clonase (tras ser descongelada 2 min en hielo). La reacción se incubó durante toda la noche a 25 °C. Tras la incubación, la enzima se neutralizó con 1 µL de proteinasa K proveniente del mismo kit, incubándola 10 min a 37 °C. Pasada la incubación se procedió a la transformación de *E.coli* mediante choque térmico tal como se describió en el apartado II.2.4.3 de Material y Métodos. Después se sembraron en placas de medio LB sólido con sus correspondientes antibióticos de selección (pK7FWG 2.0 – espectinomicina 100 µg/mL; pDEST<sup>TM</sup> 32 – gentamicina 10 µg/mL).

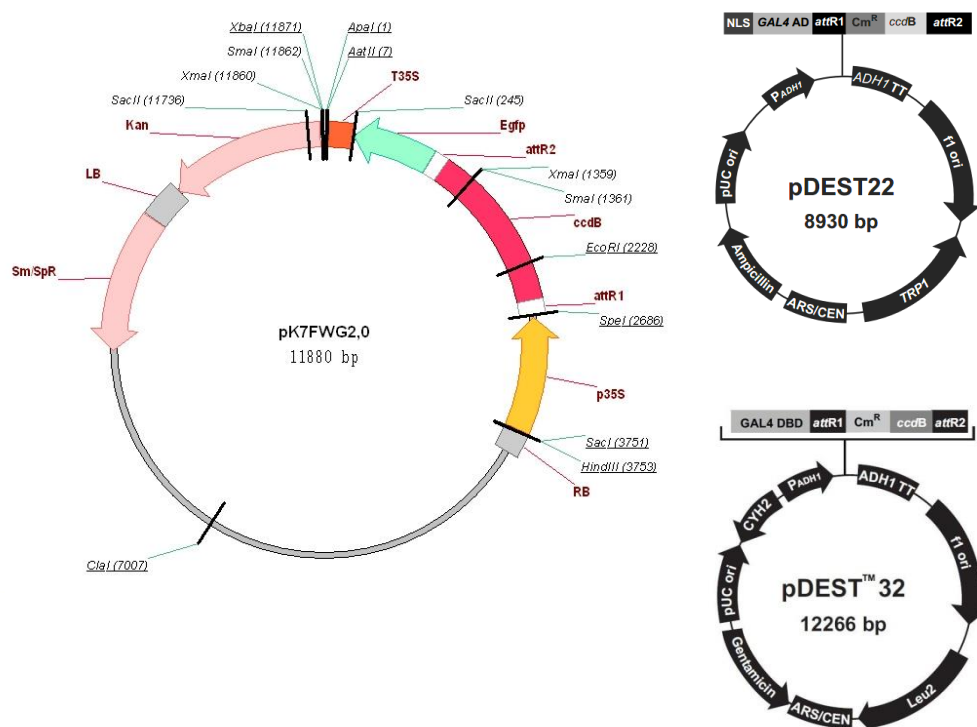


Figura 2.2: Esquemas de los plásmidos pK7FWG2, pDEST<sup>TM</sup> 22 y pDEST<sup>TM</sup> 32 (extraído <https://gatewayvectors.vib.be/collection/pk7fwg2> y de [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fproquest2hybrid\\_man.pdf&title=UHJvUXVlc3QmdHJhZGU7IFR3by1leWJyaWQGU3lzdGVt](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fproquest2hybrid_man.pdf&title=UHJvUXVlc3QmdHJhZGU7IFR3by1leWJyaWQGU3lzdGVt)).

El plásmido pK7FWG2.0 es un plásmido binario que permite la fusión de la proteína GFP (gen *Egfp*) en el extremo C-terminal de nuestra proteína en estudio. El plásmido tiene además el gen de resistencia a espectinomicina, que nos sirve para seleccionar las colonias de bacterias transformadas con este plásmido (Figura 2.2).

El plásmido pDEST<sup>TM</sup> 22 es un vector de expresión de proteínas en levaduras que tiene la secuencia del dominio de activación de la transcripción (AD) de la proteína GAL4 y que permite expresar la proteína en estudio fusionada al GAL4 AD en el extremo 5'. Además, tiene el gen de resistencia a ampicilina para seleccionar bacterias transformadas con este plásmido, y el gen *TRP1*, que confiere la capacidad de crecer sin triptófano en el medio, permitiendo seleccionar levaduras transformadas con este vector (Figura 2.2).

El plásmido pDEST<sup>TM</sup> 32 también es un vector de expresión de proteínas en levaduras que está estructurado para que, al expresar nuestra proteína esté fusionada con el dominio de unión al ADN (DBD) de la proteína GAL4 en el extremo 5'. También tiene el gen que confiere resistencia a gentamicina, para seleccionar bacterias transformadas, y el gen *Leu2*, que confiere la capacidad de crecer sin leucina en el medio, para seleccionar levaduras transformadas (Figura 2.2).

Para la clonación de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en el plásmido pDEST™ 32 y, teniendo en cuenta que la fusión de proteínas se realiza en el extremo 5', los fragmentos de los ADNcs amplificados correspondientes contenían el codón de parada en el extremo 3' mediante el uso de los cebadores descritos en el apartado II.2.4.1. Estas construcciones se usaron para estudiar posibles interacciones físicas de las proteínas *FaNAC2* y *FaNAC3* con otras proteínas, procedentes de una genoteca de ADNc de fruto rojo clonada en pDEST™ 22, cedida por el Dr. Jan Schaart, Wageningen UR Plant Breeding, The Netherlands, mediante ensayos de autoactivación en levadura tal y como se describe en los apartados siguientes.

## II.2.5 Estudio de interacción de proteínas en levadura con *FaNAC2* y *FaNAC3*

### II.2.5.1 Transformación de levadura a pequeña escala

Para la transformación de levaduras con las construcciones pDEST™ 32- *FaNAC2* y pDEST™ 32- *FaNAC3* se utilizó la cepa PJ69-4a y se procedió en base al trabajo de James et al. (1996). A partir de un cultivo de la levadura PJ69-4a crecido durante toda la noche en medio SD glucosa líquido (SD glu) (Tabla 2.4) a 28 °C en agitación, se tomaron 2 mL de cultivo para cada transformación y se hizo una dilución 1/10 con medio SD glu líquido. Este cultivo se dejó creciendo hasta que la DO<sub>600</sub> estuvo entre 0,4 y 0,6 asegurándonos de que la mayoría de células estaban en crecimiento exponencial. El cultivo se centrifugó 5 s a máxima velocidad para descartar el sobrenadante, y el pellet se resuspendió con 1 mL de LiAc 100 mM, incubándose posteriormente a 30 °C durante 5 min. Tras la incubación se volvió a centrifugar durante 10 s para descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 240 µL polietilenglicol (PEG 3350) al 50 %, 36 µL de LiAc 1 M, 5 µL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor (10 mg/mL), 3 µL (aproximadamente 500 ng) de ADN plasmídico (una transformación por cada construcción en estudio) y 76 µL de agua mili-Q, siendo todo homogenizado con un agitador de tipo vórtex. Esta mezcla fue incubada durante 20 min a 42 °C y después se centrifugó 10 s a máxima velocidad para desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con 50 µL de agua mili-Q. Por último, se sembraron las levaduras en placas con medio SD glu sólido sin leucina, para seleccionar las levaduras que se transformaron con éxito. Tras 3 días de incubación a 28 °C se comenzaron a observar colonias.

Tabla 2.4: Formulación del medio SD glu (1 L).

6,7 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco 291940)
20 g de dextrosa (D-(+)glucosa)
100 mL solución de aminoácidos 10X (Tabla Suplementaria 2.2). Dependiendo de la selección que se quiera hacer variarán los aminoácidos que se tienen que añadir.
Enrasar con agua mili-Q
pH = 5,8
Autoclavado a 121 °C durante 15 min
En caso de querer solidificar el medio se añadió Bacto agar 2 % (p/v)

#### II.2.5.2 Extracción de ADN plasmídico en *Saccharomyces cerevisiae*

Para comprobar mediante secuenciación que las transformaciones en levaduras no alteraron nuestro inserto se procedió a la extracción del ADN plasmídico. El protocolo que se siguió comenzó creciendo colonias aisladas en 2 mL de medio de selección SD glu líquido durante una noche a 28 °C en agitación. Una vez crecidas las colonias, en un tubo tipo eppendorf se centrifugaron los cultivos a máxima velocidad durante 10 s, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 200 µL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  67mM pH 7,5 y 5 µL de enzima lítica (5 unidades; Sigma-Aldrich referencia L4025-25KU). Para que la enzima lítica pudiera actuar, la reacción se incubó 1 hora a 37 °C. Tras esta incubación se añadieron 200 µL del reactivo P2 y 200 µL del tampón N3 (procedente ambos reactivos del kit *QIAprep Spin Miniprep* de Qiagen, referencia 27106). Se centrifugó 10 min a máxima velocidad para recuperar el sobrenadante y descartar el residuo restante. A este sobrenadante se le añadieron 600 µL de isopropanol, y tras mezclar, se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad. Se desechó el sobrenadante y tras lavar el pellet con 350 µL de etanol 70 % se resuspendió con 50 µL de agua mili-Q.

#### II.2.5.3 Transformación genética a gran escala de levaduras

Esta transformación se usó para introducir en levaduras que contenían el plásmido pDEST<sup>TM</sup> 32- *FaNAC2* o pDEST<sup>TM</sup> 32- *FaNAC3*, el plásmido pDEST<sup>TM</sup> 22 que contenía la genoteca de ADNc de fruto rojo cedida por el Dr. Jan Schaart. El protocolo que se siguió fue similar al descrito en el apartado II.2.5.1 (James et al., 1996). El primer paso consistió en crecer en 50 mL de SD glu líquido sin leucina levaduras que contienen pDEST<sup>TM</sup> 32 con *FaNAC2* o *FaNAC3*, a 28 °C durante toda la noche. A partir de este precultivo se obtuvo un cultivo de 300 mL con  $\text{DO}_{600}$  entre 0,4 y 0,6 en el mismo medio. Tras la centrifugación del cultivo a 1000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspendió con 1,5 mL de TE y 150 µL de LiAc 100 mM para luego añadir a la mezcla 50 µL de librería de ADNc (200-300 ng/µL), 200 µL ssADN (esperma de salmón de Invitrogen<sup>TM</sup>, referencia 10605543, desnaturalizado durante 5

min a 95 °C) y 12 mL de la mezcla previamente esterilizada compuesta por 12 mL de PEG 50 %, 1,5 mL de TE 10X y 1,5 mL de LiAc 1 M. Todo esto fue homogenizado con un agitador de tipo vórtex durante 1 min e incubado a 30 °C durante 10 min con una agitación de 200 rpm. Posteriormente, se añadió 1,4 mL de DMSO, se mezcló por inversión y se incubó en un baño de agua a 42 °C durante 30 min, para luego ser introducido rápidamente en hielo durante 2 min. Por último, tras centrifugar 2 min a 2300 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de tampón TE 1X. Las levaduras fueron cultivadas en placas con medio SD glu sólido sin leucina ni triptófano, a razón de 500 µL por placa. Tras incubar las placas 3 días a 28 °C se apreciaron colonias.

#### II.2.5.4 Ensayo autoactivación en *Saccharomyces cerevisiae*

Para comprobar si las colonias obtenidas en el apartado anterior podrían corresponder a la interacción física entre las proteínas expresadas por ambos plásmidos, al cabo de 3 días, las colonias que crecieron se replicaron en un medio SD glu sólido sin leucina, triptófano e histidina. En el caso que haya interacción entre las proteínas codificadas por los genes insertados en ambos vectores, se expresará el gen *GAL4* que conlleva la expresión de dos genes reporteros: uno de ellos confiere la capacidad de crecer en un medio libre de histidina, y otro hace que la levadura pueda crecer en un medio libre de adenina. Por tanto, sólo cuando haya interacción entre las proteínas de ambos plásmidos crecerá la levadura sin histidina.

Debido a que el gen reportero *HIS3* puede tener actividad de fondo dando lugar a falsos positivos, se procedió a realizar una nueva réplica añadiendo al medio el compuesto 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) que dificulta la síntesis de histidina, eliminando falsos positivos. Para ello, las colonias se crecieron en medio sólido SD glu sin leucina, triptófano ni histidina, añadiendo 3-AT a 15 mM. Se fue aumentando progresivamente en sucesivas réplicas la concentración de este compuesto, hasta alcanzar una concentración de 120 mM, donde se redujeron significativamente la cantidad de colonias. Aun así, para analizar solo las interacciones más fuertes, las colonias crecidas en la anterior condición se replicaron en un medio sin leucina, triptófano, histidina ni adenina (otro gen reportero más restrictivo), disminuyendo aún más el número de colonias.

Tras esta selección, se crecieron las colonias en el mismo medio de selección pero líquido, con el objetivo de extraer el ADN plasmídico (apartado II.2.5.2) y poder comprobar por secuenciación que genes en los plásmidos pDEST™ 22 son los que codifican las proteínas que están interaccionando con *FaNAC2* o *FaNAC3*. Para ello se usaron como cebadores PRO500 (Fw) y PRO501 (Rv) específicos del plásmido pDEST™ 22, en zonas colindantes al inserto (Figura Suplementaria 2.1).

Tras la secuenciación, se realizó una búsqueda de genes en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por homología de las secuencias resultantes, sabiendo así los posibles candidatos a interaccionar con *FaNAC2* y *FaNAC3*.

## II.2.6 Sublocalización celular de las proteínas *FaNAC2* y *FaNAC3*

### II.2.6.1 Predicción de localización subcelular

Se usó el programa CELLO v.2.5: subCELLular LOcalization predictor (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) para predecir la localización subcelular de *FaNAC2* y *FaNAC3*. Para ello se seleccionó la predicción en organismos eucariotas, se seleccionó ADN y se usaron las secuencias de *FaNAC2* y *FaNAC3* en formato FASTA.

### II.2.6.2 Transformación transitoria de epidermis de cebolla mediante biolística

Se usó el plásmido pK7FWG2.0 descrito en el apartado II.2.4.5 que contenía los genes en estudio *FaNAC2* y *FaNAC3*. El sistema usado fue un *PDS-1000/He™ System* (Figura 2.3) con todos los accesorios necesarios, de la casa Bio-Rad:

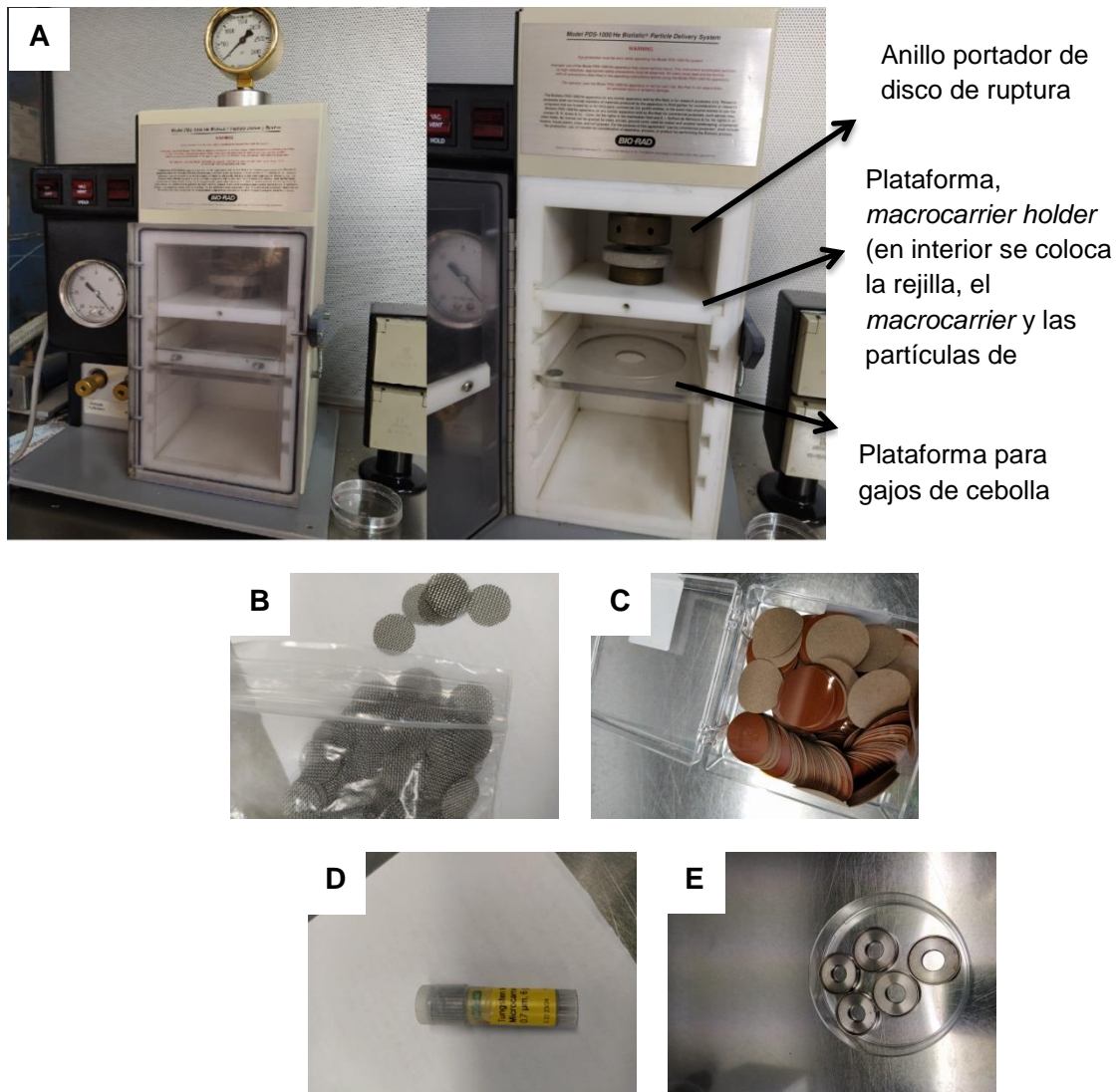


Figura 2.3: La imagen A corresponde a un *PDS-1000/He™ System*, la B a las rejillas que retienen los *macrocarriers* (C) con las partículas de tungsteno (D) que portan las construcciones génicas en los *macrocarrier holders* (E). Las imágenes fueron cedidas amablemente por la compañera Cristina Sánchez.

Previamente al bombardeo se prepararon las partículas de tungsteno, primero lavando 30 mg de partículas con 1 mL de etanol 70 % 3 veces, y agitándolas 15 min con un agitador tipo vórtex, centrifugando a 14000 g durante 10 s y eliminando el sobrenadante. Tras estos lavados con etanol se realizaron 4 lavados con agua estéril, usando 1 mL por lavado, homogenizando con un agitador de tipo vórtex durante 1 min, dejándolas reposar otro minuto, y centrifugando un par de segundos a máxima potencia. Por último, al pellet se le añadieron 500  $\mu$ L de glicerol al 50 %, homogenizando con agitador tipo vórtex y conservándolas a -20 °C hasta su uso.

Con las partículas ya preparadas, se cortaron trozos de cebolla de aproximadamente 2x2 cm, manteniéndolos en una placa petri con papel secante humedecido con tampón PIPES 20 mM pH 7,2 hasta el momento del disparo.

Previamente al disparo se adhirieron las construcciones génicas pK7FWG2.0-*FaNAC2* o pK7FWG2.0-*FaNAC3*. Para ello, en un tubo tipo eppendorf de 1,5 mL se mezclaron 4  $\mu$ L de la construcción a estudiar y 4  $\mu$ L de la construcción control con el gen *RNR* de señal roja en núcleo. La concentración que se usó fue de 250 ng/ $\mu$ L, con un total de 2  $\mu$ g de ADN. A esta mezcla se le añadieron 10  $\mu$ L de partículas de tungsteno (previamente preparadas) y 18  $\mu$ L de agua estéril, llegando a un volumen total de 36  $\mu$ L. Tras homogenizar con agitador tipo vórtex se le añadieron 30  $\mu$ L de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  2,5 M homogenizando esta vez con un suave pipeteo. Cuando la mezcla estaba bien homogenizada se añadieron 12,4  $\mu$ L de espermidina 0,1 M volviendo a homogenizar para seguir con una incubación en hielo durante 20 min mezclando cada 5 min con un agitador de tipo vórtex.

Tras la incubación se procedió a 4 lavados consecutivos con 320  $\mu$ L de etanol 100 % en cada lavado y centrifugando a 13000 g durante 20 segundos, retirando en todos los casos el sobrenadante. El último lavado se hizo con 20  $\mu$ L de etanol 100 % y, además de resuspender con agitador tipo vórtex, se procedió a la sonicación de las muestras durante 2 s. Finalmente, de esta suspensión se tomaron 10  $\mu$ L para repartirlos de forma homogénea en un *macrocarrier* previamente tratado con isopropanol. Cuando el etanol de la suspensión se evaporó el *macrocarrier* portaba las partículas de tungsteno junto con las construcciones génicas comentadas anteriormente.

Llegados a este punto se procedió al disparo o al bombardeo que se realizó en condiciones estériles en la cabina de flujo laminar. Por cada disparo se usó un *macrocarrier* (portando las partículas de tungsteno con las construcciones génicas) que fue colocado usando pinzas estériles en un *macrocarrier holder*. Luego este se colocó en la plataforma blanca, situando una rejilla metálica en medio de ambas piezas. Esta rejilla en el momento del disparo evitará que el *macrocarrier* alcance a la cebolla. Dicha plataforma blanca fue situada en la segunda ranura empezando por arriba. En cada disparo se colocó un disco de ruptura de 900 psi en el anillo de retención (que va enroscado en la parte superior). Todos estos componentes fueron esterilizados previamente con isopropanol. La cebolla fue colocada en una placa Petri con la epidermis hacia arriba, y esta placa Petri fue situada en una pletina colocada en la segunda ranura desde abajo.

Una vez colocados todos los componentes en su sitio y cerrada la puerta, se encendió el *PDS-1000/He™ System* y una bomba de vacío. Se abrió una bombona de helio

ajustándose a 1300 psi. Después se pulsó el botón "vacuum" hacia arriba y se sostuvo hasta que la aguja se movió 3/4 del recorrido completo. Inmediatamente después se cambió la posición del botón "vacuum" hacia abajo y se pulsó el botón "fire", manteniéndolo hasta que la presión en el interior rompió el disco de ruptura y se generó el disparo.

Tras el disparo, el trozo de cebolla bombardeado se incubó en placa Petri con papel secante humedecido con tampón PIPES (piperazina-N,N'-bis), con la cara bombardeada hacia abajo, durante 36 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Tras la incubación, se despegó la epidermis del trozo de cebolla y se colocó en un portaobjetos con agua destilada. Encima se puso un cubre y se observó la fluorescencia en un microscopio confocal Zeiss LSM 880.

## II.2.7 Estudio de pared celular

### II.2.7.1 Extracción de la pared celular

Las extracciones de la pared celular de frutos en estadio rojo de las líneas *FaNAC2* 11, *FaNAC2* 12, *FaNAC3* 3, *FaNAC3* 10 y control, se realizaron siguiendo el protocolo de Redgwell et al. (1992), con pequeñas modificaciones.

Por cada réplica biológica, una muestra de 10 g de fruto maduro congelado y pulverizado con nitrógeno líquido, se homogeneizó con un dispositivo Ultra-turrax con 3 "pulsos" de 30 segundos en 20 mL de solución PAW, compuesta por fenol, ácido acético y agua en proporción 2:1:1 (p:v:v). A continuación, el extracto se centrifugó a 4000 g durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de un doble filtro de muselina (Miracloth) y se almacenó a 4 °C. El precipitado se resuspendió con 10 mL de agua destilada para eliminar los restos de la solución PAW. Se volvió a centrifugar a 4000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante una vez filtrado, se unió con el sobrenadante anterior. Este paso de lavado con agua y centrifugado se repitió otra vez más, para unir de nuevo el sobrenadante. La fracción sobrenadante generada en las 3 centrifugaciones es la fracción de pectinas solubles en PAW (fracción PAW). Dicha fracción se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C para futuros estudios.

Se continuó con el precipitado. Dicho precipitado se trató con dimetilsulfóxido (DMSO) para eliminar el almidón presente. Para ello, el precipitado se resuspendió en 10 mL de DMSO al 90 % y se mantuvo en agitación suave (80 rpm) durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 4000 g durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó dos veces con 10 mL de agua, centrifugando a 4000 g durante 15 min para eliminar los restos de DMSO. En todos los pasos, se desechó el sobrenadante. El precipitado remanente constituye el extracto de pared celular.

Este extracto se liofilizó durante 24 horas para quitar toda la humedad de la muestra. Este extracto liofilizado de pared celular fue pesado para comparar los mg de pared celular/g de receptáculo entre líneas. La extracción se realizó por triplicado (tres réplicas biológicas) para cada una de las líneas.

### II.2.7.2 Preparación de la pared celular para el fraccionamiento

Las paredes celulares liofilizadas obtenidas en el paso anterior (15 en total: 2 líneas *FaNAC2*, 2 líneas *FaNAC3* y 1 línea control Chandler, cada línea con su triplicado biológico) fueron pesadas para registrar el rendimiento de cada línea y cortadas y depositadas en tubos específicos de 2 mL de capacidad para ser usados en un TissueLyser LT (Qiagen, referencia 85600). En cada tubo se añadieron 2 bolas de hierro esterilizadas específicas del TissueLyser. Una vez preparados los tubos se introdujo el rotor del TissueLyser en nitrógeno líquido y luego colocado en el homogenizador. Las muestras en los tubos específicos junto con las bolas metálicas se introdujeron también en nitrógeno líquido para luego ser introducidos en el rotor congelado para ser agitadas a 50 Hz durante 2 minutos. Que las muestras estén congeladas durante el proceso facilita la pulverización y homogenización de las paredes celulares. Tras estos dos minutos las muestras están preparadas para el fraccionamiento.

### II.2.7.3 Fraccionamiento de la pared celular

Para el fraccionamiento de la pared celular se pesaron 5 mg de cada muestra y se introdujeron en tubos específicos para el TissueLyser junto con 1,3 mL de agua estéril destilada en cada tubo. Tras ser homogenizadas las muestras en el TissueLyser a 50 Hz durante 20 min a temperatura ambiente se colocaron en un agitador de balanceo durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13500 rpm durante 5 min. El sobrenadante es la fracción agua, que contiene pectinas solubles. Esta fracción se pasó a un tubo tipo eppendorf y se congeló a -20 °C hasta su uso. Con el pellet se siguió con la extracción secuencial de pectinas añadiéndole 1,3 mL de CDTA a pH 6 y se siguió el mismo procedimiento que con la fracción agua, siendo el sobrenadante la fracción CDTA. Este paso de extracción de pectinas siguió con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M (y 0,1 % de  $\text{NaBH}_4$ ) y KOH 4 M (y 0,1% de  $\text{NaBH}_4$ ) secuencialmente, con el cuidado de abrir los tubos antes de la incubación por balanceo, para liberar gases y evitar que se abrieran los tubos. De esta forma se consiguieron las fracciones  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y KOH 4 M. A estas fracciones, antes de ser congeladas se le añadió gota a gota acetato sódico al 50 %, para neutralizar el borato sódico, ya que puede romper enlaces éster de las muestras, terminando la neutralización cuando las muestras dejaban de burbujear al entrar en contacto con el acetato sódico (para este paso se usaron tubos tipo Falcon de 15 mL, evitando riesgos de salpicaduras).

El pellet resultante se resuspendió en agua, y se dejó incubando en balanceo durante varias horas. Tras la incubación se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min para descartar el sobrenadante. Este lavado con agua se repitió una vez más para eliminar los restos de KOH 4 M. Tras los lavados el pellet fue resuspendido con 1,3 mL de tampón TRIS 1,5 M a pH 8,8 y acto seguido se le añadió 1 µg/mL de celulasa (nzytech, referencia CZ0306). Esta reacción se dejó incubando 20 horas en balanceo suave a temperatura ambiente. La fracción celulasa se recuperó del sobrenadante tras centrifugar en las mismas condiciones que las anteriores fracciones (el pellet fue desechado).

De forma paralela a la extracción secuencial anteriormente descrita, se pesaron otros 5 mg de muestra y se hizo un tratamiento con celulasa (siguiendo la misma metodología que se ha descrito en este apartado) directamente al extracto de pared celular sin fraccionar. A esta fracción se le llamó "solo celulasa".

Todas las fracciones obtenidas fueron diluidas 1:100 en PBS para realizar ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con anticuerpos monoclonales específicos de pared celular.

#### II.2.7.4 ELISA

Se hizo ELISA con todas las muestras, usando una batería de anticuerpos monoclonales específicos de diferentes epítomos de pared celular (Tabla 2.5) (referencias de anticuerpos en Tabla Suplementaria 4.1). Todos los anticuerpos fueron cedidos por el Dr. Paul Knox (Univerisdad de Leeds, Reino Unido), salvo el 10H2D12 que fue cedido por la Dra. Yoselin Benitez Alfonso (Universidad de Leeds, Reino Unido) y los INRA-RU1 y INRA-RU2 que fueron cedidos por la Dra. Marie Christine Ralet (French National Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE), Francia).

Tabla 2.5: Lista de anticuerpos monoclonales primarios usados en este experimento junto con su epítomo.

Anticuerpo primario	Epítomo
LM19	Homogalacturonano parcialmente metilado/baja esterificación
LM20	HG parcialmente metilado
JIM7	HG parcialmente metilado
LM5	Ramnogalacturonano 1 (1-4)- $\beta$ -D-galactano
LM6	RG-1 (1-4)- $\alpha$ -D-arabinano
INRA-RU1	RG-1 (esqueleto)
INRA-RU2	RG-1 (esqueleto)
LM26	RG-1 ramificación (1,6-gal)(1-4)- $\beta$ -D-galactano
LM15	Xiloglucano (motivo XXXG)
LM25	Xiloglucano (motivo XXXG/XG galactosilado)
JIM13	Proteínas arabinogalactanos
10H2D12	Calosa

Los ELISA fueron realizados en placas de 96 pocillos (Thermo Scientific™) añadiendo 100 µL de muestra diluida en PBS 1:100 por pocillo e incubando a 4 °C durante toda la noche, para que se adhiriera la muestra a la placa. Tras la incubación, las placas se lavaron 3 veces con agua del grifo, secándolas después vigorosamente golpeándola sobre papel secante. Una vez secas, se añadieron 200 µL de leche en polvo disuelta en PBS al 5 % en cada pocillo, incubándose 90 min a temperatura ambiente. Después de esta incubación las placas fueron lavadas 9 veces con agua del grifo, y secándolas vigorosamente después para continuar añadiendo en cada pocillo 100 µL de anticuerpo primario diluido 10 veces en PBS. Para que el anticuerpo primario pudiera unirse a su epítipo las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación las placas volvieron a lavarse 9 veces y volvieron a secarse de la misma forma para continuar añadiendo 100 µL por pocillo de anticuerpo secundario anti IgG de rata (salvo con los anticuerpos primarios INRA-RU1 y INRA-RU2 que se usaron anticuerpos secundarios anti IgG de ratón) unido a HRP diluido 1000 veces en mezcla de leche/PBS al 5 %. Acto seguido las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de continuar con el siguiente paso las placas volvieron a ser lavadas 9 veces y secadas. El siguiente paso consistió en añadir 100 µL de la mezcla: 18 mL de agua, 2 mL de acetato sódico 1 M pH 6, 200 µL tetrametil benzidina (10 mg/mL en DMSO, de Sigma-Aldrich con referencia 860336) y 20 µL de peróxido de hidrógeno (6 % v/v).

La acción de la proteína HRP en presencia de peróxido de hidrógeno cataliza el compuesto tetrametil benzidina, pasando de ser incoloro a tomar un color azul. Más intensidad en el color del pocillo, indica más actividad HRP, que implica más cantidad de anticuerpo secundario ligado a anticuerpo primario, y esto indica que hay más cantidad de anticuerpos primarios unidos a su epítipo, lo que de forma indirecta viene a indicarnos que a más color más cantidad de epítipos disponibles hay en esa muestra.

Esta reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de ser neutralizada añadiendo ácido sulfúrico 2,5 M. La mezcla cambia de color azul a amarillo (manteniendo la intensidad relativa entre pocillos), siendo este color estable.

Por último, las intensidades de color de los diferentes pocillos de las placas fueron medidas por espectrofotometría con un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

Para agilizar el proceso, todos los ensayos se diseñaron para poder ser realizados con pipetas de 8 canales multidispensadoras electrónicas (E4 Multi Pipette E8-200XLS+ de Rainin).

#### II.2.7.5 Cromatografía de intercambio aniónico para la detección de epítipos (EDC)

Con esta técnica se separaron las fracciones de pared celular, en poblaciones de polisacáridos neutros y ácidos, de forma que se puede hacer un estudio complementario a lo anteriormente descrito en este trabajo de pared celular. La base de esta técnica, es que las pectinas queden retenidas en una columna de intercambio aniónico: cuando suministremos un tampón de acetato sódico sin sal añadida, las

pectinas neutras de la columna irán eluyendo; conforme se vaya aumentando la concentración de NaCl en el tampón, se irán eluyendo pectinas más ácidas de la columna, de esta forma podemos separar las pectinas de las diferentes fracciones según su fuerza iónica.

Se usó el sistema *BioLogic LP System* de Bio-Rad, que consta de: un punto de entrada, donde se puede inyectar con una jeringuilla la muestra o el tampón correspondiente. Además dicho sistema de entrada consta de dos posiciones con dos tubos colectores A y B, por donde fluyen los diferentes componentes; columna de intercambio aniónico, donde quedan retenidas de forma diferencial la muestra, dependiendo de su carga iónica; el dispensador, que se encarga de suministrar la cantidad de componente en tubo A y componente en tubo B, que se haya seleccionado; una bomba, que permite la correcta circulación de los fluidos; un recolector, que va distribuyendo la muestra una vez pasada por la columna en un megabloque de 96 pocillos de 2 mL de volúmenes y de un centro de mandos, que controla y sincroniza todo el mecanismo. Todo este sistema está conectado a un ordenador con el software *LP Data view*, que nos permite registrar los niveles de conductividad (Figura 2.4).

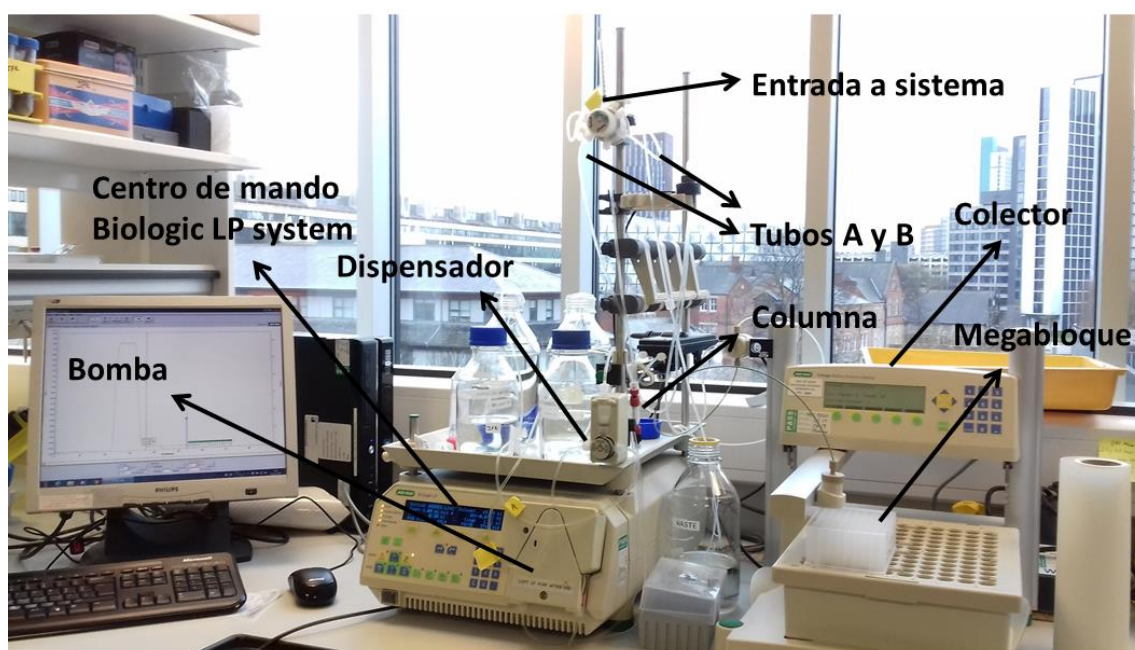


Figura 2.4: Fotografía de BioLogic LP System (Bio-Rad) usado para la cromatografía de intercambio aniónico para la detección de epítomos (EDC). Se indican los diferentes componentes del sistema: bomba inyectora, centro de mando, dispensador, punto de entrada, tubos A y B, columna de intercambio aniónico, colector de muestras y megabloque (fotografía de elaboración propia).

Para esta técnica se usaron dos tampones (A y B), ambos con 500 mM de acetato sódico y con pH ajustado a 4,5, la diferencia está en la cantidad de NaCl ya que el tampón A no tiene mientras que el tampón B lo contiene a una concentración de 1 M. También se usó NaOH 0,1 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M y etanol al 20 %.

Antes de proceder a la separación por intercambio aniónico las muestras fueron dializadas en tubos tipo eppendorf de 1,5 mL frente a agua destilada, durante 24 h a 4

°C en agitación, siguiendo el protocolo de Stanton et al. (2011). Para ello se utilizaron membranas de 12000-14000 Da de tamaño de poro renovando el agua 3 veces.

Primero se equilibró la columna de intercambio aniónico lavándose con agua destilada durante 10 min y, saturándola con el tampón B y desaturándola con el tampón A. El resto del sistema también fue lavado con agua destilada y preparado con tampón A.

Una vez preparado el sistema, se inyectó 1 mL de muestra dializada (al dializar las muestras aumentaron un tercio su volumen, pasando de 500  $\mu$ L a 750 $\mu$ L) diluida 1:1 con tampón A. Una vez retenida la muestra en la columna se fue cambiando el porcentaje de los tampones que fue pasando por la columna con un flujo de 1 mL/min. La muestra recogida hasta el pocillo 36 del megabloque fue eluída exclusivamente con tampón A, desde el pocillo 36 hasta el 72 fue aumentando gradualmente el porcentaje de tampón B y, desde el pocillo 72 hasta el 96 la muestra fue arrastrada exclusivamente por el tampón B. De esta forma, conforme iba aumentando la concentración de sal en el flujo iban eluyéndose diferentes poblaciones de polisacáridos en base a su naturaleza química.

Entre muestra y muestra la columna fue desaturada con tampón A, limpiada con NaOH 0,1 M y preparada de nuevo con tampón A. Las columnas se reutilizaron hasta un máximo de 5 veces, conservándose a 4 °C en etanol al 20 % durante la noche.

A las muestras recogidas por este procedimiento se les corrigió el pH para realizar ELISA (pH óptimo entre 7 y 9) añadiendo en cada pocillo del megabloque 40  $\mu$ L de carbonato sódico 1 M, mezclando bien por pipeteo. Estas muestras con el pH corregido fueron conservadas a -20 °C hasta su uso. Para los ELISA posteriores, se usaron 100  $\mu$ L de esta mezcla por reacción, realizando todos los pasos descritos en el apartado II.2.7.4 variando únicamente el tiempo de incubación antes de neutralizar con ácido sulfúrico, aumentándolo a 8 min debido a la mayor dilución de estas muestras.

## II.2.8 Análisis estadístico

Los datos fueron representados con Microsoft Excel 2010, salvo la figura tipo volcán, que fue incluida por la empresa Novogene en el informe de resultados de secuenciación de las muestras. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa IBM SPSS 22.0. Se comprobó que las muestras seguían una distribución normal y que eran homocedásticas (prueba de Levene). En caso de que pasaran las dos pruebas se realizó una t-Student para comparar medias de muestras independientes, o un ANOVA para comparaciones múltiples, seguido de una separación de medias mediante el test de Tukey. En caso de que los datos no siguieran una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación de medias. En caso de que las muestras siguieran una distribución normal pero no fueran homocedásticas se realizó una comparación múltiple T2 de Tamhane. En todas las pruebas  $P = 0,05$ .



## II.3 Resultados

### II.3.1 Transformación, regeneración y aclimatación de plantas de fresa *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' con los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados

Se obtuvieron plantas transgénicas regeneradas a partir de discos de hoja y, multiplicadas *in vitro*. Una vez aclimatadas en condiciones controladas se mantuvieron en un invernadero de contención para su caracterización (Figura 2.5). Con el gen *FaNAC2* silenciado se obtuvieron 19 líneas independientes con una eficiencia del 9,5 % de transformación, mientras que con el gen *FaNAC3* silenciado se obtuvieron 9 líneas independientes con una eficiencia del 4,5 %.

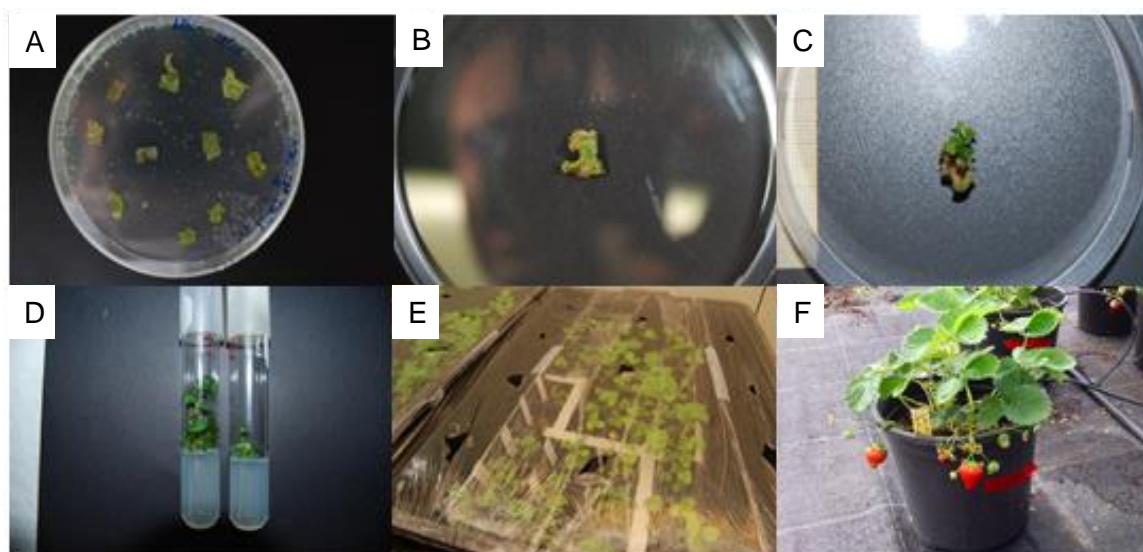


Figura 2.5: Diferentes etapas en la transformación de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' mediante *Agrobacterium tumefaciens*: discos de hoja (A); formación de callo (B); formación de explanto (C); multiplicación y selección de plantas *in vitro* (D); aclimatación en tierra bajo condiciones controladas (E); paso a macetas en invernadero (F).

### II.3.2 Niveles relativos de expresión génica

A partir de los análisis de expresión realizados a los primeros frutos obtenidos de cada construcción, se seleccionaron las líneas 11, 12 y 17 en el caso de *FaNAC2* y las líneas 3 y 10 en el caso de *FaNAC3*, ya que estas fueron las líneas que presentaron un mayor grado de silenciamiento (Figura 2.6).

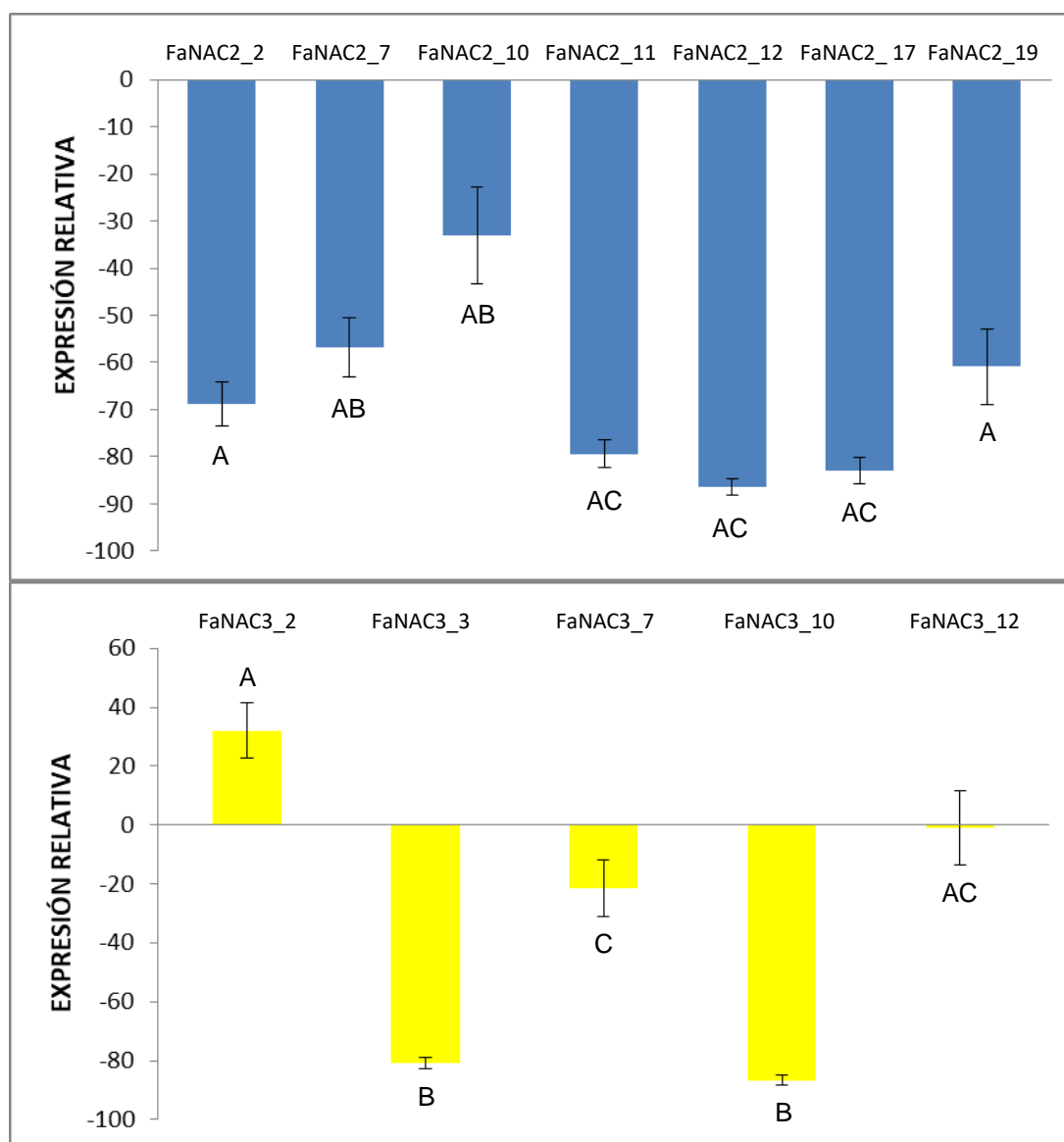


Figura 2.6: Porcentaje de expresión relativa génica de *FaNAC2* (arriba) y *FaNAC3* (abajo) en frutos de las diferentes líneas obtenidas. El nivel de expresión de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* se expresa como porcentaje con respecto al nivel de los mismos en frutos control del cultivar Chandler sin transformar. Los grupos en cada subconjunto de datos con la misma letra no presentaron diferencias significativas según una prueba T2 de Tamahane ( $p < 0,05$ ).

### II.3.3 Seguimiento del desarrollo y la maduración de los frutos

Se hizo un seguimiento de frutos procedentes de las líneas *FaNAC2* 11, *FaNAC2* 12, *FaNAC3* 3 y *FaNAC3* 10 comparándose con frutos controles no transformados que se desarrollaron en paralelo. En este seguimiento se observó que los frutos presentaron cierta variabilidad en el tiempo de desarrollo, incluyendo los frutos control, dependiendo del mes en el que se realizara el ensayo. La aparición de pigmentos ocurrió alrededor del día 20 en la mayoría de los frutos (Figura 2.7). Un hecho destacable es que los frutos de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC2* 12 vieron retrasada la maduración (siendo más evidente en estadios avanzados de la maduración),

especialmente en la línea *FaNAC2* 12, y en la mayoría de los casos no se alcanzó una maduración completa, obteniéndose una sobremaduración en la zona apical de los frutos mientras que la zona basal no presentaba pigmentación. Sin embargo, los frutos control y los frutos de las líneas *FaNAC3* 3 y *FaNAC3* 10 tuvieron un tiempo de maduración similar y con una pigmentación homogénea (Figura 2.7 y Figura 2.8).

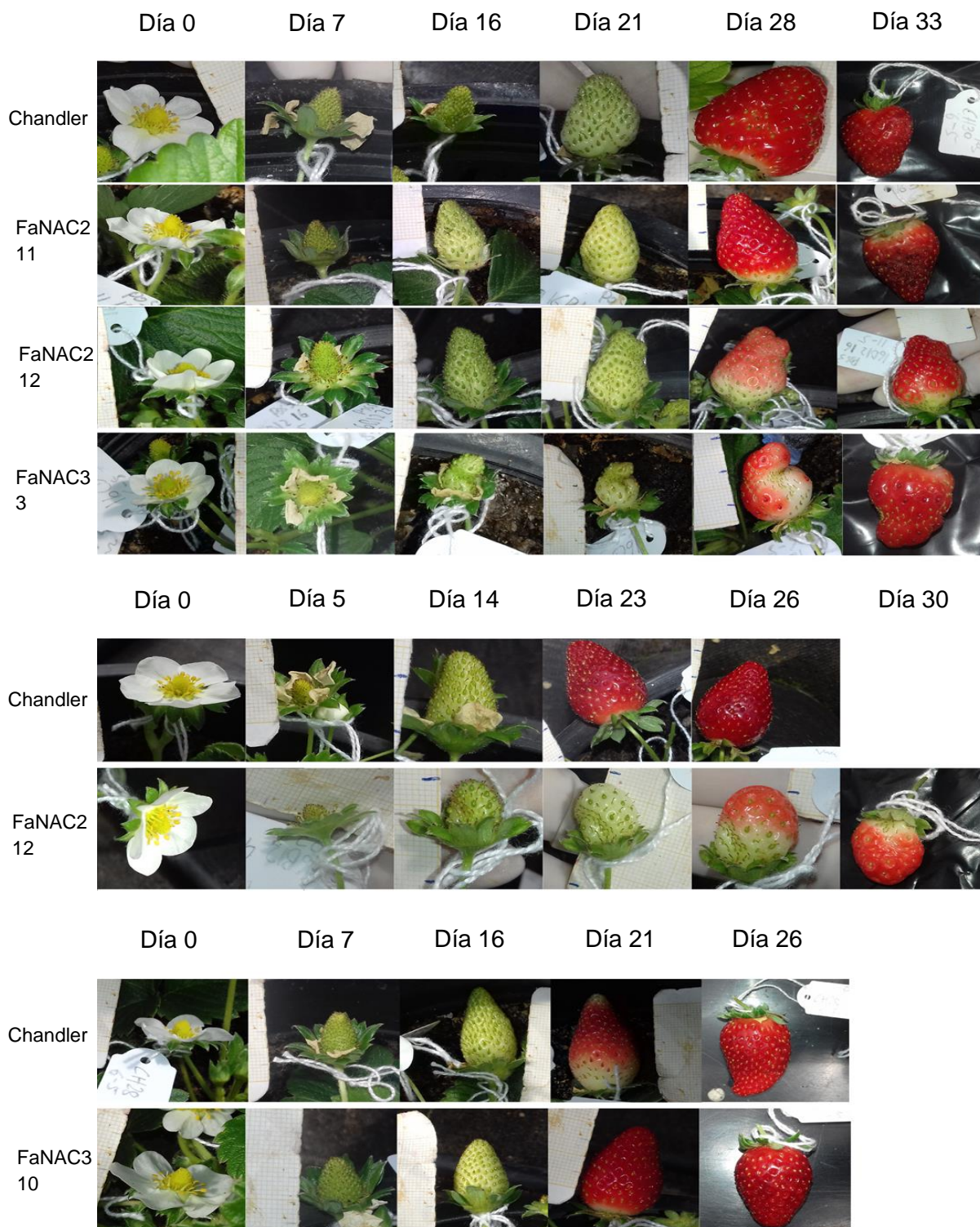


Figura 2.7: Desarrollo de frutos de las líneas *FaNAC2* 11, *FaNAC2* 12, *FaNAC3* 3, *FaNAC3* 10 y de la línea control sin transformar Chandler registrado mediante fotografías tomadas en diferentes días tras la antesis de la flor.



Figura 2.8: Frutos procedentes de las líneas *FaNAC2* 11, *FaNAC3* 10 y control sin transformar Chandler, cosechados 26 días después de la antesis.

### II.3.4 Fenotipado

Tanto a los frutos maduros de las líneas seleccionadas *FaNAC2* 11, 12, 17 y *FaNAC3* 3 y 10 como a los frutos control no transformados cosechados en los mismos días se les midió la longitud, la anchura y la firmeza, además de cuantificar la cantidad de sólidos solubles, el peso y el color, para poder compararlos.

Los frutos analizados de las diferentes líneas transgénicas de *FaNAC2* y *FaNAC3* fueron significativamente más pequeños que los frutos control. Esto se vio reflejado en una reducción en el peso, mostrándose en los frutos de todas las líneas transgénicas una disminución de la media de al menos 2 g con respecto a los frutos control, que mostraron valores medios entre 7,6 y 9 g aproximadamente, a excepción de los frutos de la línea *FaNAC2* 12 que no presentaron una reducción significativa con un peso medio de 6,3 g (Figura 2.9). Excepto los frutos de la línea *FaNAC3* 10 que tuvieron una longitud media alrededor de 2,5 cm, en el resto de los grupos de frutos transgénicos analizados la longitud media fue de 2,2-2,3 cm, siendo significativamente menor que la de los frutos control que mostraron valores medios entre 2,5-3 cm (Figura 2.10). La anchura de los frutos también se vio reducida significativamente en los frutos de las líneas *FaNAC2* 11 y de ambas líneas *FaNAC3*, siendo la anchura media en estos grupos de frutos inferior a 2 cm mientras que las medias en todos los grupos control no bajaron de este valor. Los frutos de las líneas *FaNAC2* 12 y 17 no mostraron diferencias significativas con respecto a sus controles, tomando valores cercanos a 2 cm (Figura 2.11).

En cuanto a la firmeza del fruto, el silenciamiento de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* provocaron diferentes efectos. En el caso de las líneas *FaNAC2* los frutos analizados mostraron un aumento significativo en la firmeza con respecto a sus respectivos controles, siendo este aumento de al menos 50 g, estando los valores medios de los frutos transgénicos alrededor de 400-450 g. Sin embargo, el silenciamiento de *FaNAC3* no alteró la firmeza de forma significativa en los frutos de las dos líneas analizadas, siendo la firmeza media alrededor de 350 g (Figura 2.12).

Los valores de los sólidos solubles tan solo se vieron afectados de forma significativa en los frutos de la línea *FaNAC3* 10 que mostraron una reducción cercana de 0,5 °Bx, siendo el valor medio 6,8 °Bx. Los frutos del resto de líneas no mostraron diferencias significativas con respecto a sus frutos controles. Los frutos de las líneas *FaNAC2* 11, 12 y 17 mostraron valores medios de 7,4; 8,4 y 7,9 °Bx, respectivamente, mientras que los frutos de la línea *FaNAC3* 3 presentaron un valor medio de 6,8 °Bx (Figura 2.13).

En cuanto al color, la zona media de los frutos de todas las líneas *FaNAC2* analizadas mostraron un comportamiento homogéneo en todas las variables estudiadas con respecto a los frutos de la línea control, viéndose incrementadas en los frutos transgénicos: en la variable  $L^*$  (luminosidad) los frutos transgénicos tuvieron valores medios comprendidos entre 40 y 44 mientras que en los frutos control fueron cercanos a 34; en la variable  $a^*$  (coordenadas rojo +/- verde -) los frutos control mostraron valores cercanos a 39 mientras que los frutos transgénicos *FaNAC2* se mantuvieron cerca de 42 a excepción de la línea 17 cuyo valor medio fue de 40, siendo esta la única comparación entre los frutos *FaNAC2* y controles que no mostró diferencias significativas en el color; en la variable  $b^*$  (coordenadas amarillo +/- azul -) los frutos transgénicos mostraron valores medios entre 28 y 31 mientras que los frutos control estuvieron cerca de 21; en la variable  $C^*$  (saturación) los frutos control mostraron valores aproximados a 44, siendo en los frutos transgénicos aumentado en 8 puntos aproximadamente y en cuanto a la variable  $h^*$  (matiz) los frutos transgénicos mostraron valores medios entre 33 y 37 mientras que en los frutos control cercano a 28. Los frutos de las líneas *FaNAC3* mostraron resultados heterogéneos en cuanto al color, ya que los de la línea 3 vio aumentado el color en todas las variables cuantificadas de forma significativa con respecto a los frutos control mientras que los frutos de la línea 10 no mostraron diferencias significativas en ninguna de las variables. El incremento de las variables cuantificadas registrado en los frutos de la línea 3 con respecto a los frutos control fue aproximadamente de 4 puntos en la variable  $L^*$ , de 3 en la variable  $a^*$ , de 7 en la variable  $b^*$ , de 6 en la variable  $C^*$  y de 5 en la variable  $h^*$  (Figura 2.14).

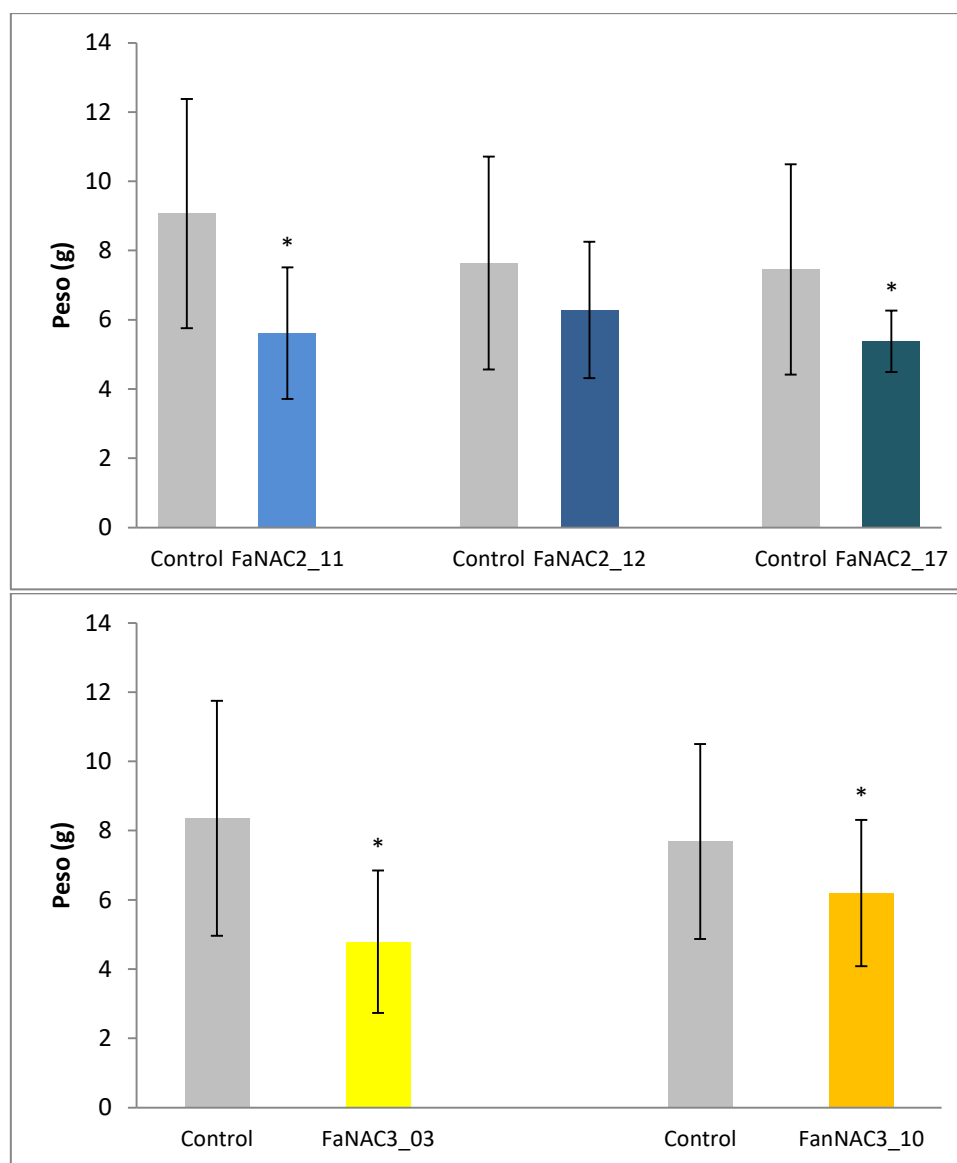


Figura 2.9: Peso en gramos de los frutos transgénicos de las líneas FaNAC2 y FaNAC3 junto con los frutos no transformados recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control tras la prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

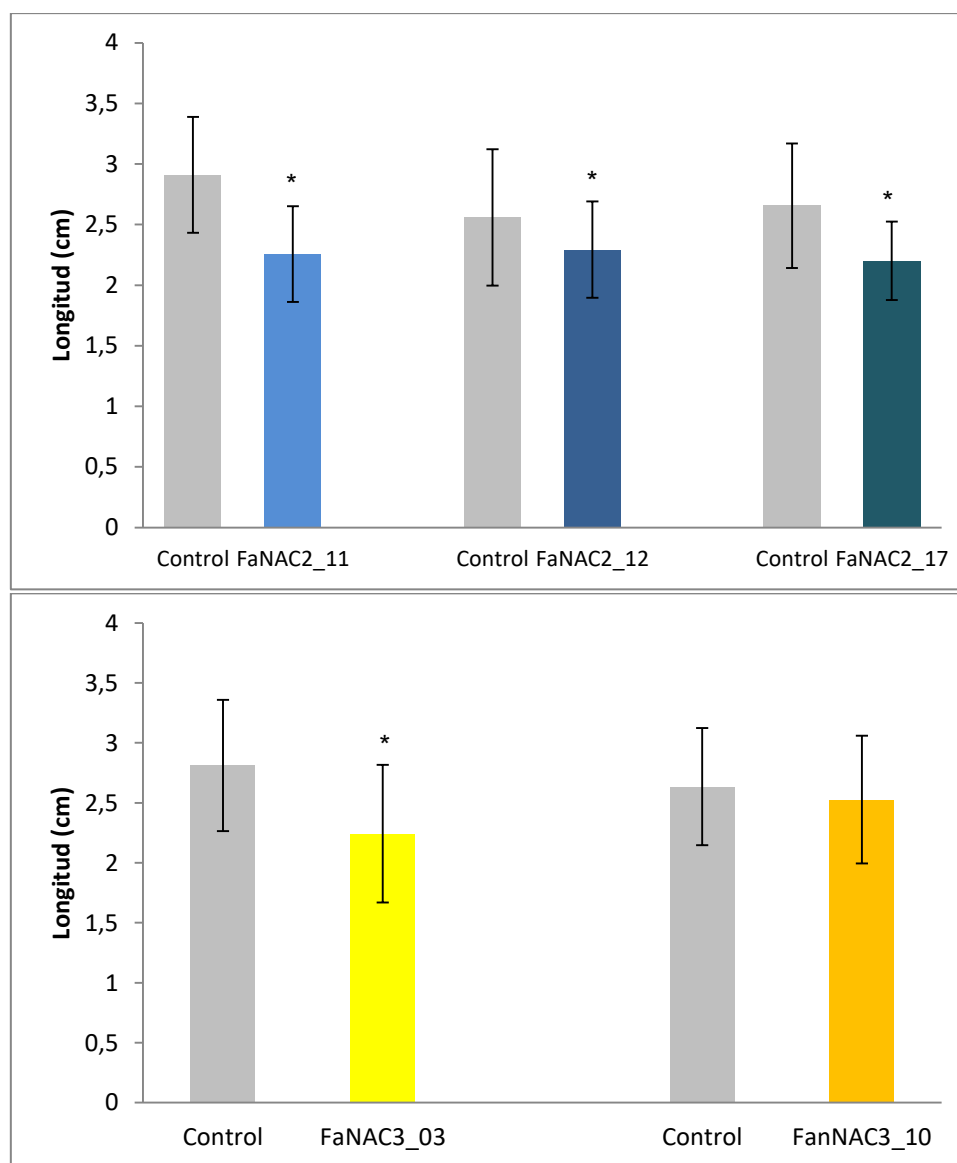


Figura 2.10: Altura en centímetros de los frutos transgénicos de las líneas FaNAC2 y FaNAC3 junto con la de los frutos control recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control según una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ), o una U de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) para los frutos de la línea 3 de FaNAC3.

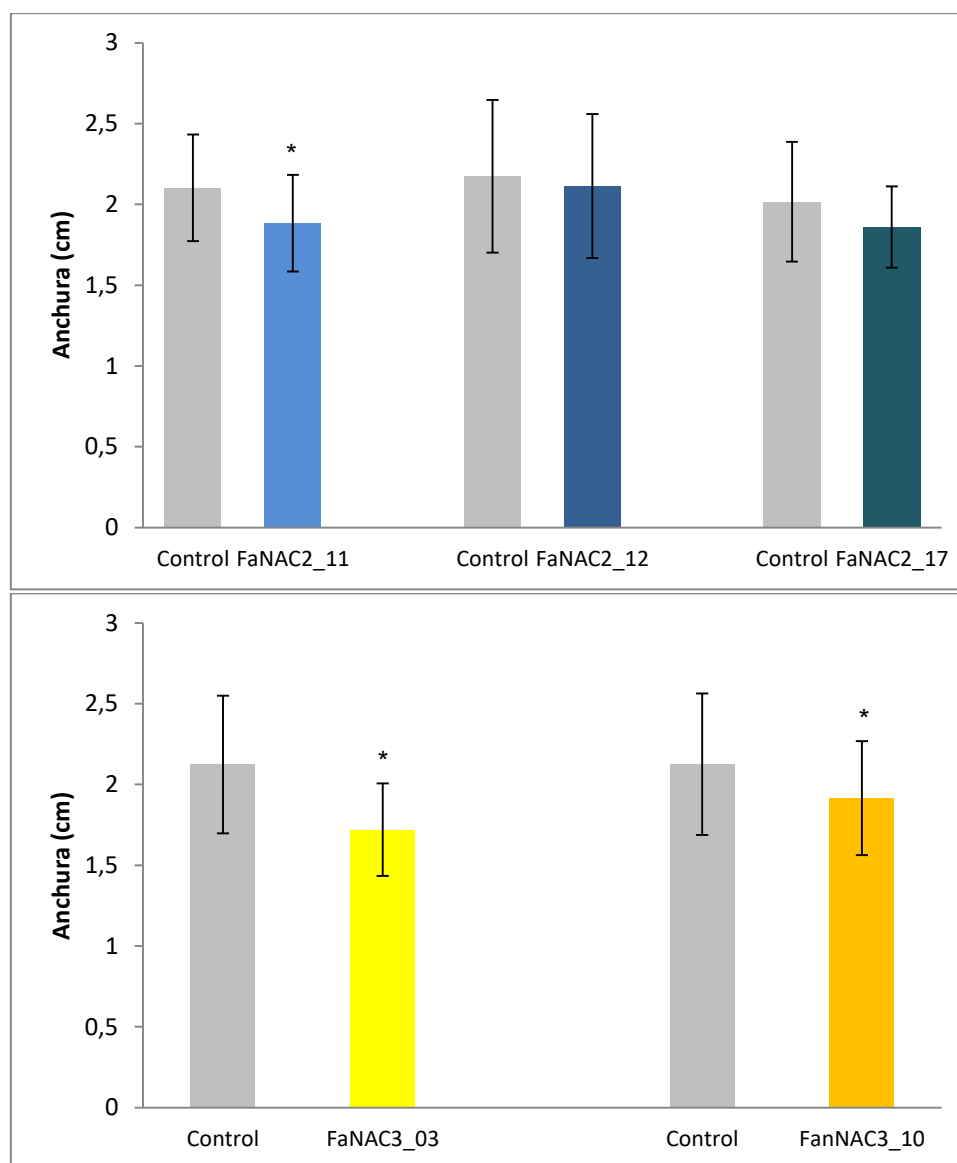


Figura 2.11: Anchura en centímetros de los frutos transgénicos de las líneas FaNAC2 y FaNAC3 junto con la de sus frutos control recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control según una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ), o una U de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) para los frutos de la línea 10 de FaNAC3.

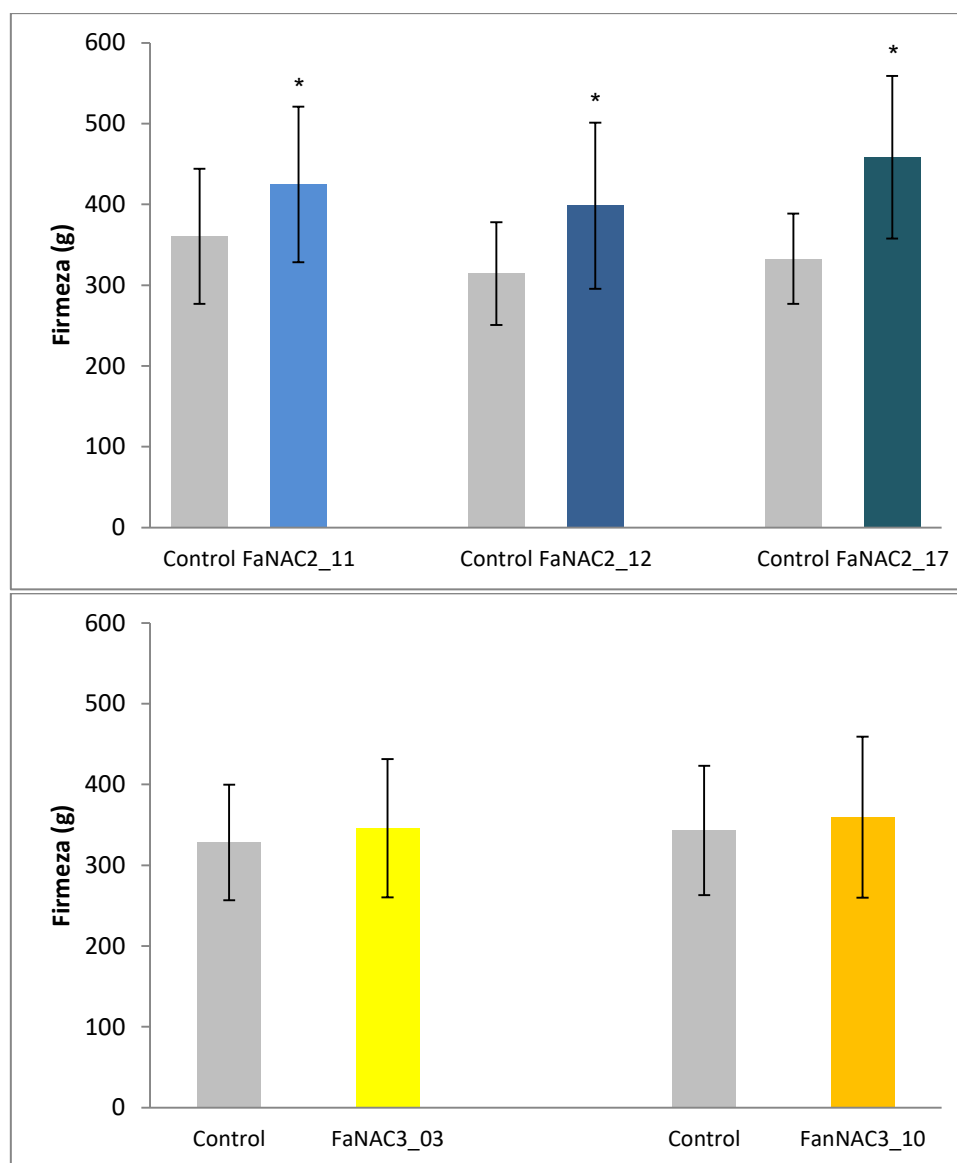


Figura 2.12: Firmeza en gramos de los frutos transgénicos de las líneas FaNAC2 y FaNAC3 junto con la de sus frutos control recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control según una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ) en los frutos de la línea 11 de FaNAC2, o una U de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ) para los frutos del resto de líneas.

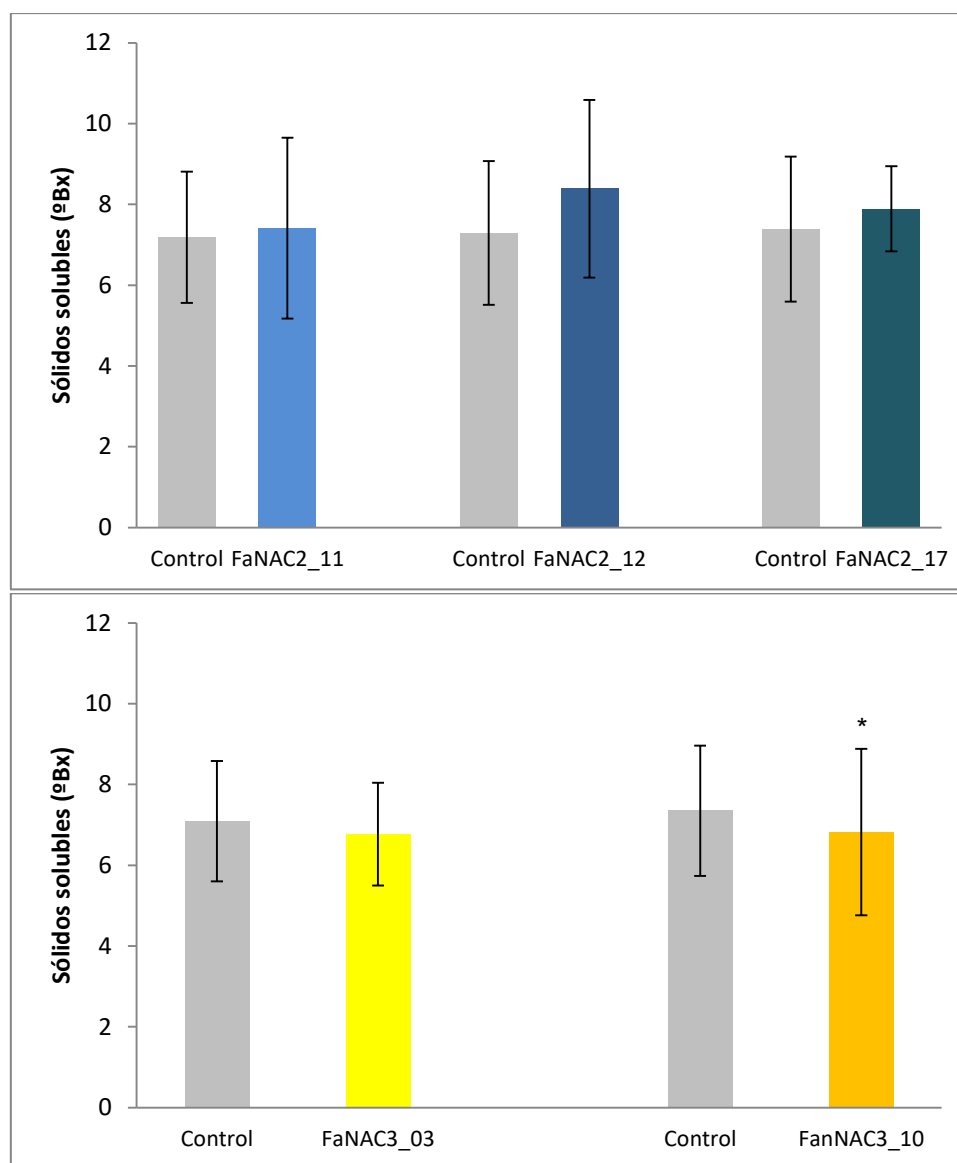


Figura 2.13: Cantidad de sólidos solubles en grados Brix (°Bx) de los frutos transgénicos procedentes de las líneas con *FaNAC2* y *FaNAC3* junto a sus controles recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a los frutos control según una prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

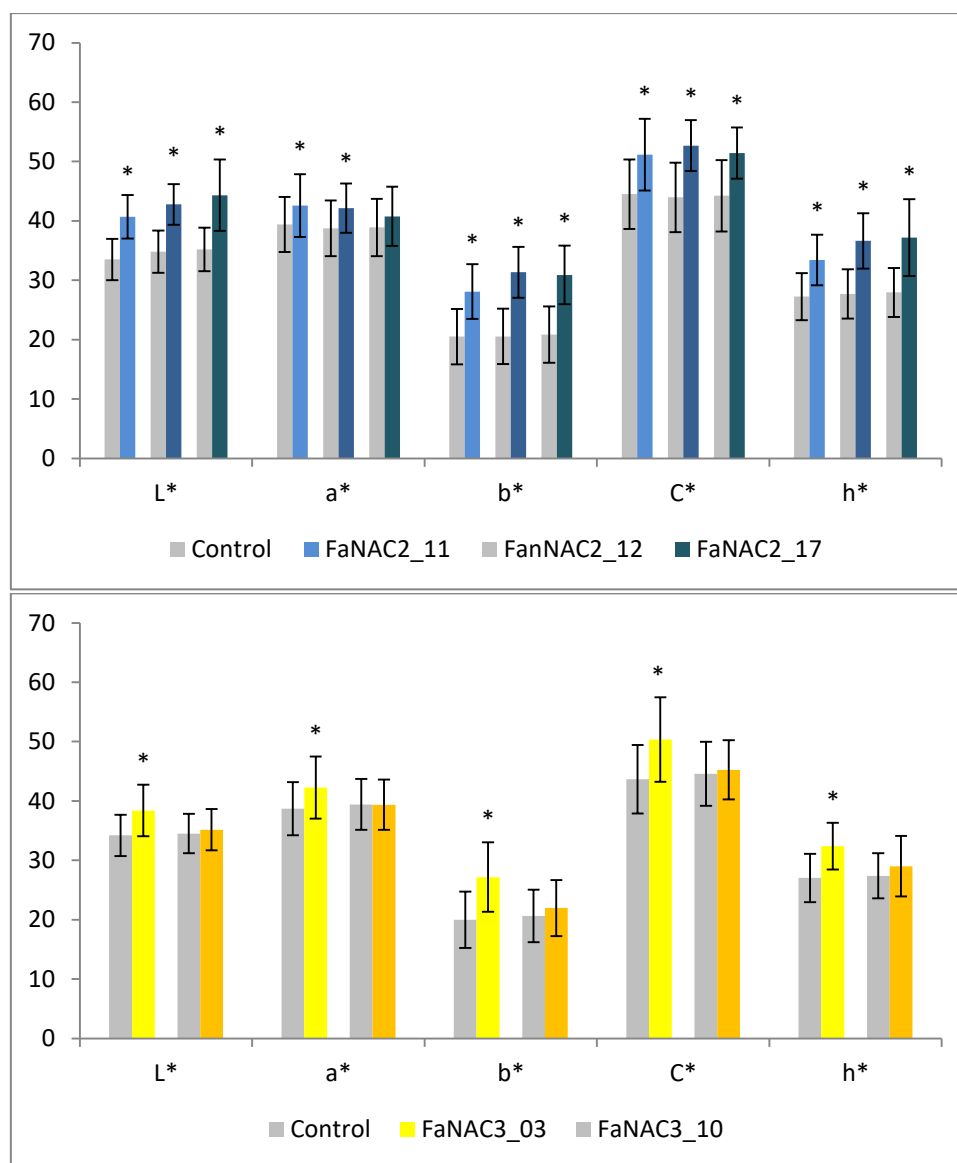


Figura 2.14: Cuantificación del color de los frutos transgénicos en el espacio de color (L\*, a\*, b\*, C\* y h\*) de las líneas FaNAC2 y FaNAC3 con sus respectivos controles recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto a sus frutos control según una prueba t de Student, salvo en la coordenada a\* con las líneas FaNAC2 17, FaNAC3 03 y FaNAC3 10 y en la coordenada h\* con la línea FaNAC3 10 que se realizó una U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Tras hacer el fenotipado, como los frutos de las líneas FaNAC2 analizadas mostraban diferencias en el color y en la firmeza con respecto al control, se realizaron fotografías del interior de frutos maduros mediante un corte longitudinal (Figura 2.15).

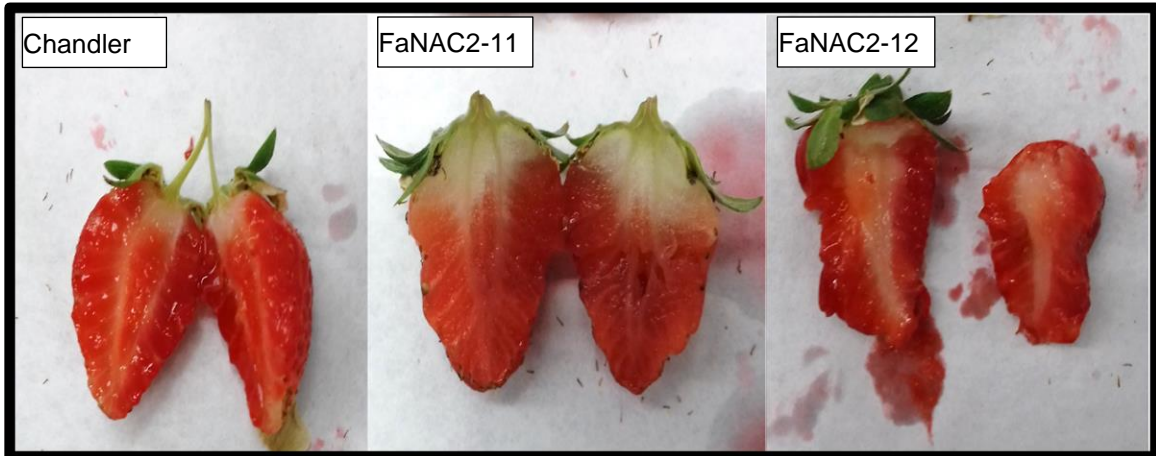


Figura 2.15: Frutos maduros de las líneas Chandler, FaNAC2 11 y FaNAC2 12, enteros (fila de arriba) y abiertos longitudinalmente (fila abajo).

En un examen visual se observó que los frutos transgénicos de las líneas FaNAC2 11 y FaNAC2 12 presentaban formas más irregulares y, en ocasiones, también una maduración irregular por zonas. En los cortes longitudinales se aprecian diferencias con respecto al control: el fruto control tiene el centro de la médula roja, mientras que el fruto de la línea 11 lo tiene en menor proporción coloreado y el de la línea 12 lo tiene completamente blanco. El fruto de la línea 11 no tiene una coloración homogénea y la zona donde se ancla el pedúnculo es mucho más grande que en el fruto control. En cuanto al fruto de la línea 12, no tiene coloreada la médula, y muestra el mismo signo en la zona de anclaje del pedúnculo que el fruto de la línea 11, pero menos acusado. En cuanto al parénquima, el fruto de la línea 11 mostró una coloración más heterogénea que el fruto control. En la fotografía del fruto de la línea 12 se aprecia el contraste de un parénquima muy maduro, y una médula totalmente blanca (Figura 2.15).

### II.3.5 Ensayo de autoactivación en *Saccharomyces cerevisiae*

Debido a que los FTs tipo NAC pueden interactuar con otras proteínas (Yong et al., 2019), se hizo un escrutinio con una genoteca de ADNc de frutos rojos de *Fragaria vesca* buscando posibles interacciones a través de un ensayo de autoactivación en levadura. Mediante el uso del sistema Gateway, los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* se introdujeron en el plásmido pDEST<sup>TM</sup> 32, mientras que la genoteca se encontraba en el plásmido pDEST<sup>TM</sup> 22. Una vez co-transformada la levadura con los dos plásmidos (experimentos independientes), y crecida bajo condiciones selectivas, se amplificó por PCR las diferentes colonias y se enviaron a secuenciar. Del FT *FaNAC2* se secuenciaron 21 productos de PCR mientras que del FT *FaNAC3* fueron 28. Los resultados positivos de las secuenciaciones se reflejan en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6 Resultados más probables de NCBI tras hacer búsqueda de genes con secuencias homólogas a los resultados de las secuenciaciones de los productos de PCR de las colonias de levadura.

FaNAC2	FaNAC3
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína monosacárido-señal 2 ( <a href="#">XM_011466724.1</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ATP sintasa subunidad épsilon, mitocondrial ( <a href="#">XM_004303791.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> serina hidroximetiltransferasa 4 ( <a href="#">XM_004296934.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína 1 de ubiquitina pegada en membrana ( <a href="#">XM_004304200.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> histona H2B-like ( <a href="#">XM_004294672.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> syntaxina-61 ( <a href="#">XM_011462735.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> KRR1 subunidad pequeña del proteosoma ( <a href="#">XM_004292348.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> actina-7 ( <a href="#">XM_004306544.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> subunidad C de ATPasa tipo V ( <a href="#">XM_011469905.1</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> probable fosfoinositida fosfatasa SAC9 ( <a href="#">XM_011465923.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> nicalin-1 ( <a href="#">XM_004291647.2</a> )	<i>Fragaria x ananassa</i> putativa quinona oxidorreductasa ( <a href="#">AY048861.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> no caracterizado ( <a href="#">XM_004307031.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> glutamato decarboxilasa 4-similar ( <a href="#">XM_004299440.2</a> )
<i>Fragaria x ananassa</i> 'Chandler' gen HyPRP ( <a href="#">AY530533.1</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> 40S proteína ribosomal S4-3 ( <a href="#">XM_004294732.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> chaperona CPN60-2, mitocondrial-like ( <a href="#">XM_004289981.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> ubiquitina-40S proteína ribosomal S27a ( <a href="#">XM_004297343.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> mRNA para metalotioneína ( <a href="#">AJ001444.1</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> sustrato receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 15-like1 ( <a href="#">XM_004290018.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> acuaporina NIP1-1-like ( <a href="#">XM_004302249.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> probable ramnogalacturonano liasa B ( <a href="#">XM_004287274.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> 40S proteína ribosomal S13 ( <a href="#">XM_004306882.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína 1 de unión a guanilato inducida por interferón ( <a href="#">XM_004290598.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína NRT1/ PTR familia 2.8 ( <a href="#">XM_004305126.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína 3 de unión a poli (rC) ( <a href="#">XM_004296445.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> oxigenasa cloroplástica feofórbida ( <a href="#">XM_004294454.2</a> )	<i>Fragaria x ananassa</i> probable aldo-keto reductasa ( <a href="#">AF039182.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> factor transcripción MYB114-like ( <a href="#">XM_004302169.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína de poro de la envoltura externa 24B, cloroplástica ( <a href="#">XM_004291839.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> peamaclein ( <a href="#">XM_004290899.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína RABA1d ( <a href="#">XM_004293922.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> factor 3	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> probable

despolimerización de actina ( <a href="#">XM_004302727.2</a> )	pectato liasa 8 ( <a href="#">XM_004289681.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína homóloga dnaJ ( <a href="#">XM_004291480.2</a> )	<i>Fragaria chiloensis</i> cloroplasto, genoma completo ( <a href="#">JN884816.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> factor de transcripción TFIID subunidad 1 ( <a href="#">XM_011471100.1</a> )	<i>Fragaria vesca</i> mRNA para proteína putativa metalotioneína ( <a href="#">AJ001444.1</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> glutamato deshidrogenasa 2 ( <a href="#">XM_004307719.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> 187-kDa proteína asociada a microtúbulos AIR9 ( <a href="#">XM_004293948.2</a> )
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> proteína myb 306 ( <a href="#">XM_004304249.2</a> )	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> heat shock factor protein HSF8 ( <a href="#">XM_004300174.2</a> )
	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> glutatión S-transferasa F11-like ( <a href="#">XM_004288530.2</a> )
	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> acil-[acil-carrier-proteína] desaturasa, cloroplástica like ( <a href="#">XM_004302135.2</a> )

De estos resultados se puede resaltar que el factor de transcripción *FaNAC2* podría interactuar con dos FTs de la familia MYB, un probable MYB114-like nombrado como *FaMYB10* en *F. x ananassa* (en NCBI [XM\\_004302169.2](#) y en GDR [FvH4\\_1g22020.1](#)) relacionado con el cambio de color del fruto de blanco a rojo durante la maduración (Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015), y MYB-related protein 306 (en NCBI [XM\\_004304249.2](#) y en GDR [FvH4\\_6g48630.1](#)) cuyo ortólogo en *Arabidopsis thaliana* llamado *AtMYB30* está relacionado con la síntesis de ácido salicílico (Raffaele et al., 2006). Otro resultado destacable es la histona H2B-like (en NCBI [XM\\_004294672.2](#) y en GDR [FvH4\\_3g40690.1](#)), relacionada con diversas funciones en *Arabidopsis*, incluida la participación en la defensa frente a patógenos (Zou et al., 2014).

En el caso del factor de transcripción *FaNAC3*, entre las proteínas identificadas la proteína HSF8 (en NCBI [XM\\_004300174.2](#) y en GDR [FvH4\\_5g22720.1](#)) podría ser una candidata ya que es un factor de choque térmico que juega un papel importante en la expresión de genes en respuesta a calor y a otros estreses abióticos y bióticos (Hu et al., 2015).

### II.3.6 Localización subcelular de *FaNAC2* y *FaNAC3*

#### II.3.6.1 Predicción de localización subcelular

Puesto que se han descrito FT tipo NAC con péptidos señal de localización fuera del núcleo, se realizó una predicción de la localización subcelular de ambos NAC de fresa, utilizando el programa "Cello" (Figura Complementaria 2.1). Los resultados mostraron que la localización subcelular más fiable para ambas proteínas NAC fue el núcleo, adquiriendo en ambos casos una fiabilidad de 4 y 3,5 respectivamente.

### II.3.6.2 Biolística

Los estudios de co-bombardeo realizado en epidermis de cebolla con el control de núcleo de señal roja (RNR) y cada FT unido al gen GFP de señal verde, demostraron que las proteínas *FaNAC2* y *FaNAC3* están localizadas en el núcleo. La señal verde coincide con el núcleo de la imagen del campo claro (sin fluorescencia), y a su vez con el control de núcleo de señal roja (Figura 2.16).

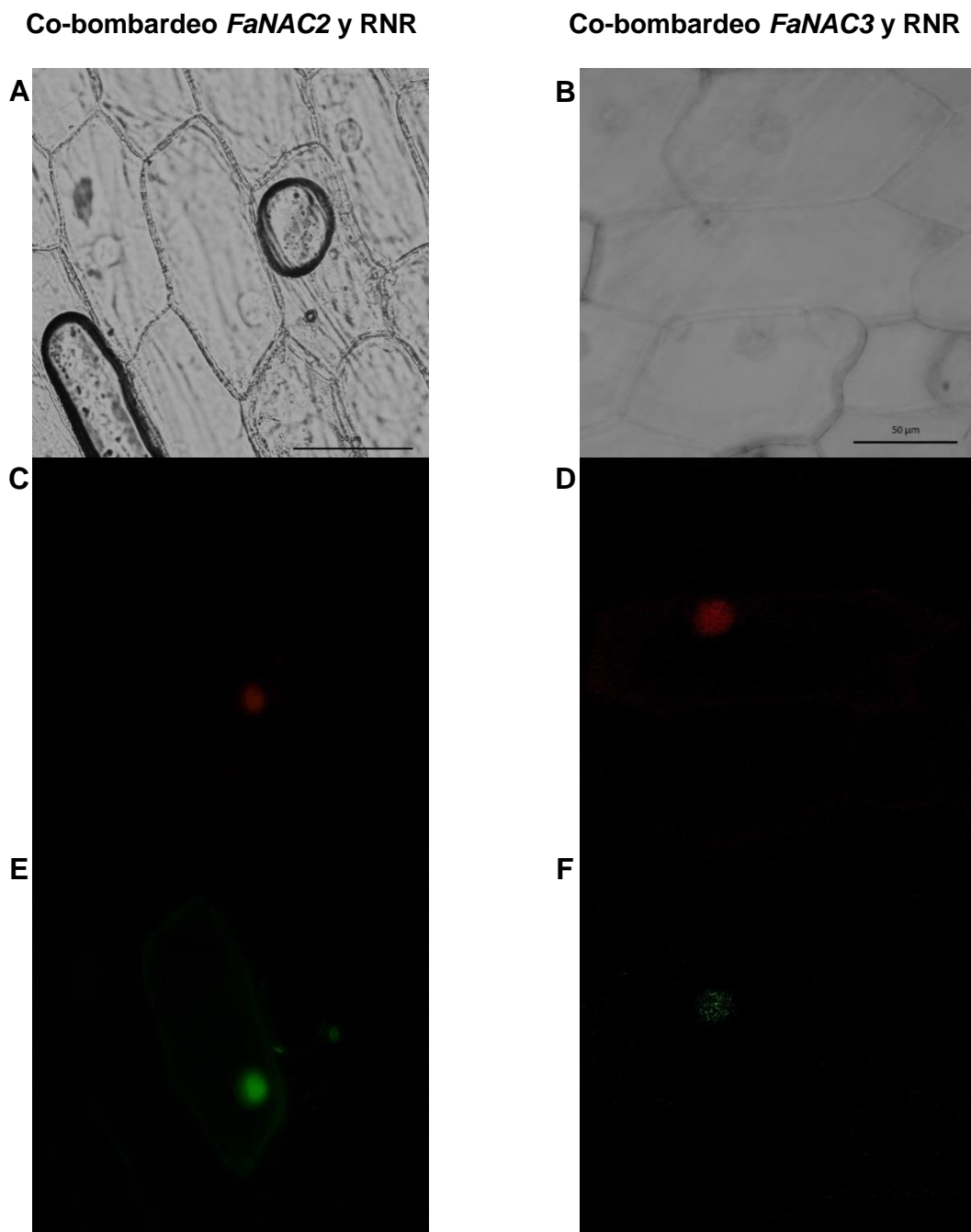


Figura 2.16: Localización subcelular de las proteínas *FaNAC2* y *FaNAC3* de fresa en célula de epidermis de cebolla mediante co-bombardeo de un control de núcleo con señal roja (RNR) y con *FaNAC2* (columna izquierda) o *FaNAC3* (columna derecha) unidos al gen *Egfp* codificante de proteína con señal verde. A y B: imagen de campo claro (sin fluorescencia); C y D: imagen con señal emitida por la proteína RNR; E y F: imagen con señal emitida por la proteína GFP.

### II.3.7 Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN

El análisis de la expresión génica a partir de la secuenciación masiva del ARN de frutos rojos de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3 permitió identificar numerosos genes que estaban afectados por el silenciamiento mediante ARNi de los genes *FaNAC2* y *FaNAC3* en la planta de fresa. Antes del análisis cuantitativo de expresión génica se comprobó que el experimento cumplía una serie de condiciones que indicaran que era reproducible. Para ello se analizaron una serie de parámetros, siendo el valor de estos parámetros similar en las 3 réplicas de las 3 líneas analizadas. Una condición analizada fue la tasa de error de las bases, mostrando un valor de 0,01. Otra característica que se tuvo en cuenta es que al menos el 97 % de bases presentaron más del 99 % de tasa de reconocimiento (parámetro Q20), y más de un 93 % de las bases un 99,9 % de tasa de reconocimiento (parámetro Q30). Además, el porcentaje de GC se situó en torno al 45 % en todas las réplicas de las muestras, siendo registradas de forma uniforme durante la secuenciación (<https://drive.google.com/drive/folders/142dEU-Uk5HYqj0BjFIAYJTZ-vu8Uvk5L?usp=sharing>).

Por otro lado, en torno al 50 % de las lecturas fueron mapeadas con éxito y, tan sólo, el 1 % aproximadamente presentaron un mapeado múltiple. Por último, los coeficientes de Pearson mostraron una correlación de al menos 0,97 entre las cuantificaciones de expresión génica de las diferentes réplicas ([https://drive.google.com/file/d/1bfl5D0PVwATijfX6X9CoGlxfcj6G\\_f3/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1bfl5D0PVwATijfX6X9CoGlxfcj6G_f3/view?usp=sharing)).

En el caso de *FaNAC2*, 1994 genes presentaron una expresión significativamente diferente a la de los frutos control, siendo 1280 genes sobreexpresados y 714 silenciados. *FaNAC3* por su parte, afectó a la expresión de 2319 genes, de los cuales 1352 fueron sobreexpresados y 967 fueron silenciados (Figura 2.17) (lista de genes diferencialmente expresados en [https://drive.google.com/file/d/1EqUfxAMuLw1eD4T5s\\_Effyth1zQfq0fh/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1EqUfxAMuLw1eD4T5s_Effyth1zQfq0fh/view?usp=sharing)).

Mediante el diagrama de Venn se representaron los genes comunes en frutos de ambas líneas que están silenciados (172) y genes comunes que están sobreexpresados (214). También se identificaron el número de genes que mostraron una alteración en la expresión opuesta en ambas líneas, siendo 117 genes sobreexpresados en la línea *FaNAC2* 11 y reprimidos en la línea *FaNAC3* 3, y 76 genes que fueron sobreexpresados en frutos de la línea *FaNAC3* 3 y reprimidos en la línea *FaNAC2* 11. Además, 1415 genes fueron únicamente alterados con el silenciamiento de *FaNAC2*, viéndose en 949 un aumento en la expresión y en 466 una reducción. En el caso de la línea *FaNAC3* 3, 1740 genes fueron los alterados únicamente al silenciar *FaNAC3*, estando 1062 sobreexpresados y 678 reprimidos (Figura 2.18).

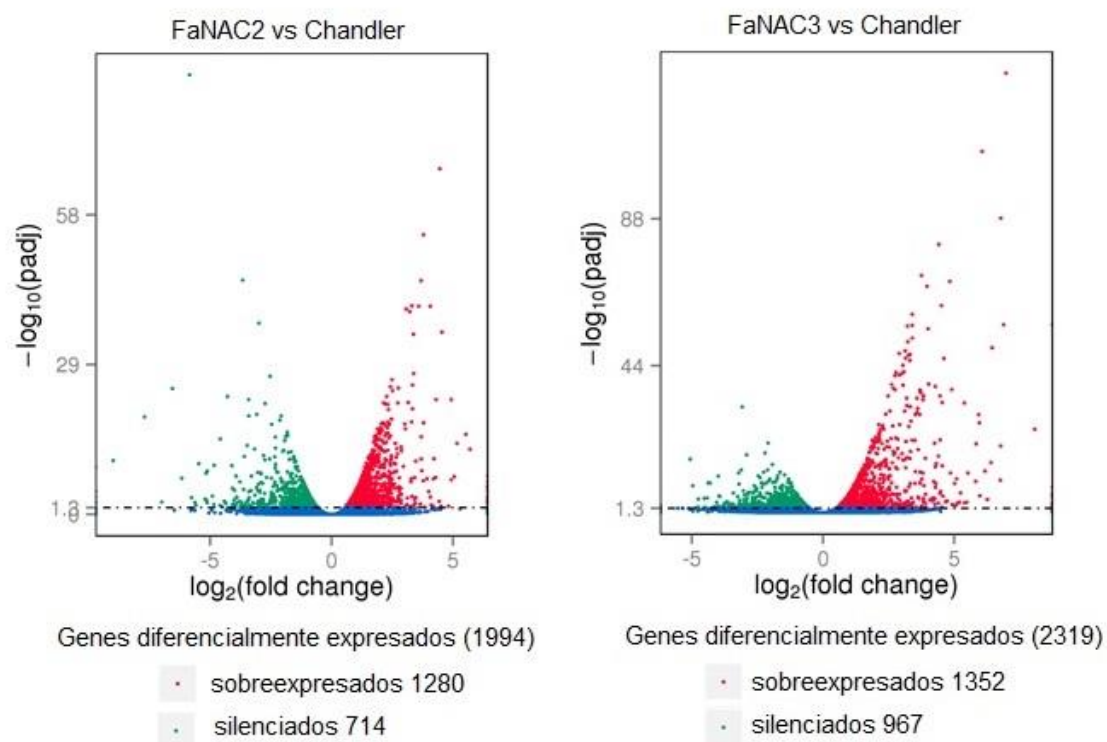


Figura 2.17: Representación de los genes diferencialmente expresados en los frutos rojos de fresa con *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciados. En verde se representan los genes silenciados, mientras que en rojo los genes sobreexpresados. El eje X representa el  $\log_2$  del ratio entre las lecturas del gen en la población de transgénicos y en los controles, de forma que cuanto más polarizado el valor más diferencia de expresión con respecto al control. El eje Y representa  $-\log_{10}$  de padj (p-value normalizado por el método FDR de Benjamini and Hochberg), indicados en azul los genes que no mostraron una expresión diferencial significativa.

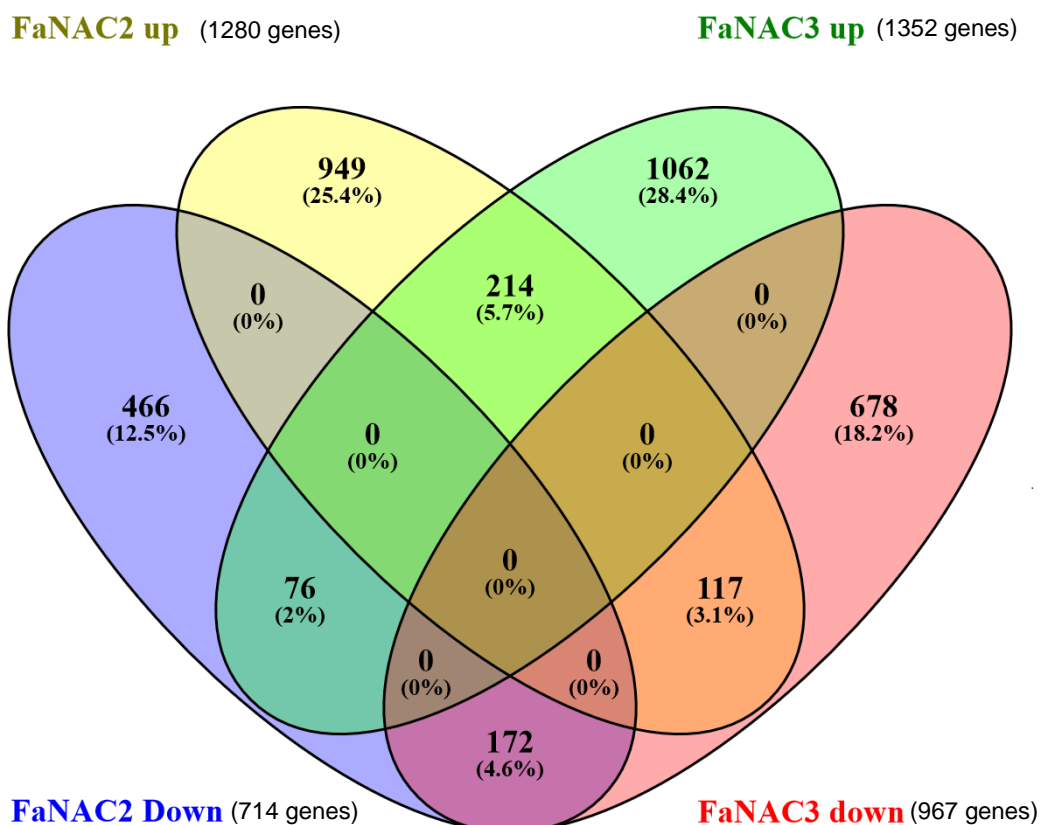


Figura 2.18: Diagrama de Venn donde se representan los genes sobreexpresados (up) y reprimidos (down) en los frutos de las líneas FaNAC2 11 y FaNAC3 3, con respecto a los de la línea control. La zona amarilla representa los genes sobreexpresados exclusivamente en los frutos de FaNAC2 11, la zona verde los sobreexpresados exclusivamente en los frutos de la línea FaNAC3 3, la zona azul los reprimidos en los frutos de la línea FaNAC2 11 y la zona roja los reprimidos en los frutos de la línea FaNAC3 3. Las zonas representadas con los demás colores indican los genes diferencialmente expresados comunes a las dos líneas modificadas.

Al comprobar que el silenciamiento de *FaNAC2* y *FaNAC3* (en la secuenciación de ARN de los frutos de la línea FaNAC2 11 *FaNAC2* presentó una expresión del 45,8 %, mientras que en la línea FaNAC3 3 *FaNAC3* mostró una expresión del 21,7%. Sin embargo en la qPCR ya se ha comentado que la expresión de estos genes fue inferior al 25 % en sus respectivas líneas) alteró la expresión de numerosos genes, y que había genes con alteraciones similares en ambas líneas, otros con alteraciones opuestas y otros que únicamente se vieron alterados en una línea, se optó por hacer un estudio de las rutas metabólicas alteradas en la línea FaNAC2 11 y FaNAC3 3 que pudieran afectar al desarrollo y maduración del fruto. Para simplificar el estudio se han tenido en cuenta genes que mostraron un  $\log_2$  fold change de al menos  $\pm 1,5$  (Tablas Suplementarias 2.3-2.6) salvo en casos excepcionales donde se indica de forma explícita el valor.

En la línea FaNAC2 11 se registraron alteraciones en la expresión génica de proteínas involucradas en la traducción de señales de fitohormonas: hubo una reducción en la expresión de genes codificantes de proteínas relacionadas con la señal de auxina, en

concreto en la de un gen codificante de una proteína de tipo AUX/IAA (FvH4\_4g21780.1) y en la de 5 genes codificantes de proteínas SAUR (FvH4\_2g10850.1, FvH4\_5g22620.1, FvH4\_5g22610.1, FvH4\_5g22830.1 y FvH4\_2g10810.1). La vía de señalización mediante giberelinas mostró una sobreexpresión de un gen codificante de un regulador negativo DELLA (FvH4\_4g24820.1). En la vía del ABA también hubo una menor expresión de dos genes codificantes de receptores tipo PYR/PYL (FvH4\_3g07710.1 y FvH4\_5g22060.1). La ruta de señalización mediante etileno mostró una sobreexpresión de 4 genes codificantes de 4 probables proteínas efectoras de tipo ERF (FvH4\_1g09180.1, FvH4\_2g26080.1, FvH4\_2g26630.1 y FvH4\_2g06060.1) y una gran represión de dos genes que expresan factores de transcripción efectoras de tipo AP2 (FvH4\_7g05910.1 y FvH4\_7g06420.1), ambos con un  $\log_2$  fold change de al menos -4,4. En la vía de señalización de los brasinoesteroides se registró una sobreexpresión de un gen codificante de un represor de tipo BRI1 KINASE INHIBITOR (BKI1) (FvH4\_2g34560.1) (Figura 2.19).

La línea *FaNAC3* 3 también mostró alteraciones en la expresión génica de proteínas involucradas en la transducción de señales de algunas fitohormonas: en la vía de señalización de la auxina se reprimieron 2 genes codificantes de proteínas de tipo AUX/IAA (FvH4\_2g35280.1 y FvH4\_6g31930.1) y se sobreexpresó un gen codificante de una proteínas tipo ARF (FvH4\_7g32600.1). En cuanto a la vía de señalización de las citoquininas se reprimieron genes codificantes de un modulador positivo de tipo CRE1 (FvH4\_4g33130.1) y de un represor de tipo A-ARR (FvH4\_5g16240.1), mientras que se sobreexpresó un gen codificante de una proteína B-ARR (FvH4\_4g19230.1). La transducción de señales promovidas por el ABA también mostró una sobreexpresión de un gen codificante de un modulador positivo de tipo PYR/PYL (FvH4\_2g32040.1), mientras que la ruta de señalización mediada por etileno mostró una represión de dos genes codificantes de proteínas efectoras ERF (FvH4\_4g03470.1 y FvH4\_7g28960.1). La respuesta mediada por ácido jasmónico mostró una reducción en la expresión de un gen codificante una proteína represora JAZ (FvH4\_1g09070.1) (Figura 2.19).

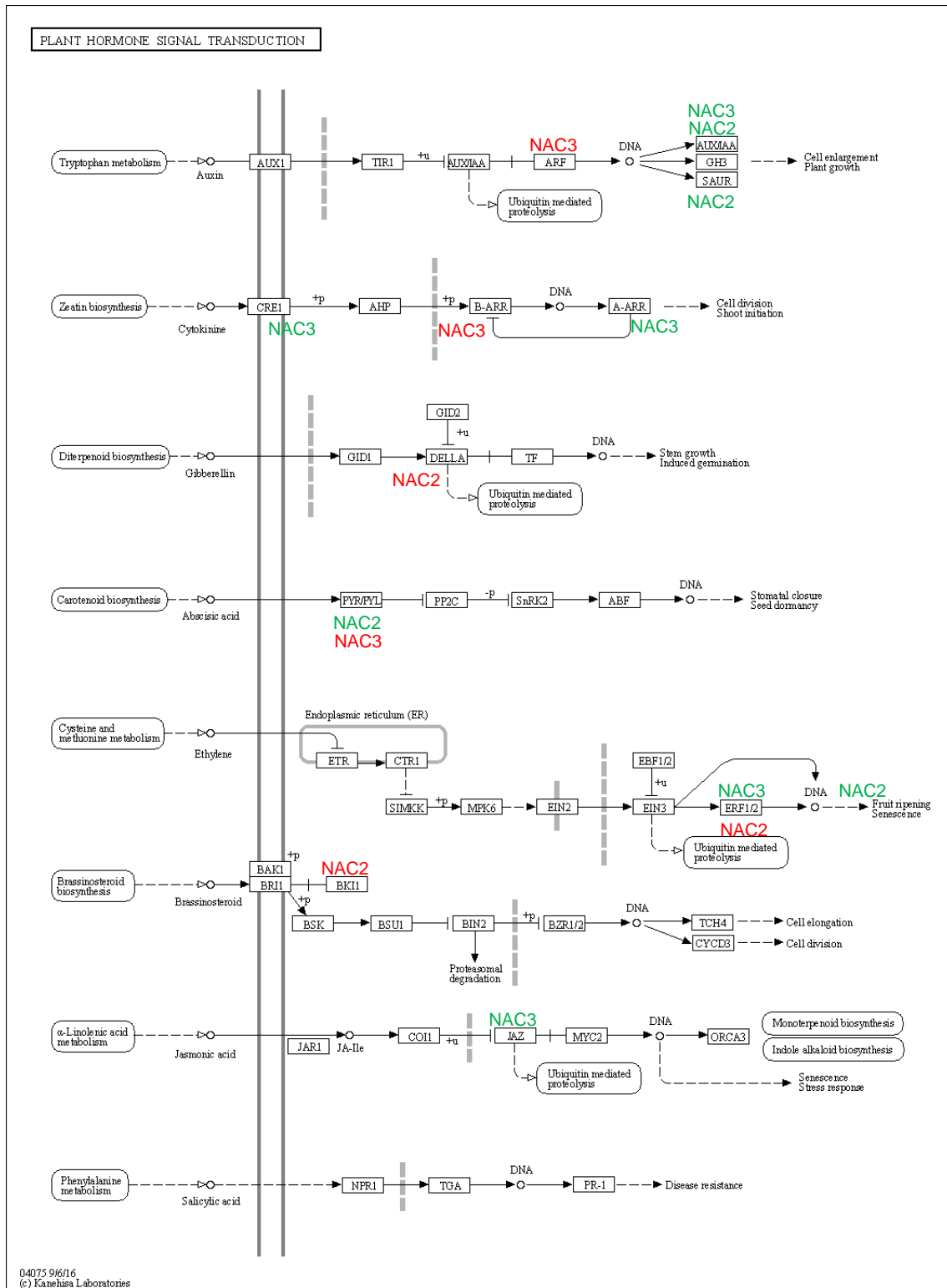


Figura 2.19: Alteraciones en la expresión génica de las vías de señalización de las diferentes fitohormonas en frutos de la línea *FaNAC2* 11 (*NAC2*) y *FaNAC3* 3 (*NAC3*) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.

Por otro lado, la expresión génica de rutas biosintéticas de varias fitohormonas también se vieron alteradas al silenciar *FaNAC2*: la ruta biosintética de fenilalanina, tirosina y triptófano, precursora de la auxina, mostró una reducción en la expresión de 3 genes uno codificante de la enzima antranilato sintasa 1 (FvH4\_4g33060.1), otro codificante de la enzima tirosina aminotransferasa (FvH4\_3g19340.1) ( $\log_2$  fold change de -1,1) y otro que expresa una fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa ( $\log_2$  fold change de -1,3) (Figura Suplementaria 2.2). La biosíntesis de las giberelinas también mostró una reducción en la expresión de un gen codificante de la enzima clave para sintetizar la forma activa  $GA_4$  (FvH4\_6g30780.1), la giberelina 3- $\beta$  dioxigenasa. Además, se sobreexpresó un gen codificante de una enzima giberelina 2- $\beta$  dioxigenasa (FvH4\_4g36510.1) encargada de catabolizar la forma activa  $GA_4$  (Figura Suplementaria 2.3). La biosíntesis de carotenoides, que desemboca en la formación de ABA también fue alterada en la línea *FaNAC2* 11 disminuyendo la expresión del gen codificante de enzimas fitoeno sintasa (FvH4\_6g38780.1) ( $\log_2$  fold change -1,4), cuya acción se sitúa al inicio de la ruta metabólica, encargadas de forma secuencial de transformar el esqueleto de los terpenos en fitoeno, precursor de las diferentes ramas de la ruta. También se redujo la expresión de 2 genes codificantes de 2 enzimas involucradas en la síntesis de ácido abscísico a partir de violaxantina, 2 genes que codifican a la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 1 y 2 "NCED 1 y 2" (FvH4\_3g16730.1 y FvH4\_3g05440.1) ( $\log_2$  fold change -1,4 y -1,5). Además, se reprimieron 3 genes codificantes de enzimas ácido abscísico 8' hidroxilasa (FvH4\_2g39460.1, FvH4\_1g12750.1 y FvH4\_2g34420.1) ( $\log_2$  fold change -4,6; -4 y -1,3), que metaboliza la forma activa de ABA. Sin embargo, se sobreexpresó un gen codificante de otra ácido abscísico 8' hidroxilasa (FvH4\_5g25150.1) y otro gen codificante de la enzima nombrada como  $\beta$ -caroteno 3-hidroxilasa 1 (FvH4\_5g03020.1) que está involucrada en la síntesis de luteína a partir de  $\alpha$ -carotenos, en la conversión de  $\beta$ -carotenos a zeaxantina y en la síntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -carotenos también (Figura Suplementaria 2.4). La biosíntesis del etileno, mediante el metabolismo de la cisteína y la metionina, también sufrió varias alteraciones en la expresión génica de sus enzimas, siendo la alteración más destacable la sobreexpresión de un gen (FvH4\_2g21910.1) y la represión de tres codificantes de enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (FvH4\_1g07190.1; FvH4\_3g01280.1 y FvH4\_3g31880.1), clave en la síntesis de esta hormona (Figura Suplementaria 2.5). En cuanto a la síntesis de ácido jasmónico que depende del metabolismo de los ácidos  $\alpha$ -linolénicos, los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron una sobreexpresión de 5 genes en etapas iniciales del metabolismo incluyendo dos que codifican la enzima linolato 9S-lipoxigenasa (FvH4\_3g43540.1 y FvH4\_3g43530.1) ( $\log_2$  fold change 3,8 y 1,1), pero una represión de dos genes codificantes de enzimas tipo 12-oxofitodionato reductasa (FvH4\_1g08470.1 y FvH4\_5g32750.1) ( $\log_2$  fold change -3,9 y -1,2), que son clave en el proceso (Figura Suplementaria 2.6). Los frutos de la línea *FaNAC2* 11 también mostraron alteraciones en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de brasinoesteroides, aunque no fueron muy elevadas mostraron una sobreexpresión generalizada, destacando el aumento de expresión del gen codificante de una brasinoesteroide oxidasa (FvH4\_6g46500.1) ( $\log_2$  fold change 1,3) (Figura Suplementaria 2.7).

Las biosíntesis de varias hormonas también mostraron expresión diferencial en algunos genes en frutos de la línea 3 con *FaNAC3* silenciado. En la biosíntesis del

triptófano que desemboca entre otras cosas en la síntesis de auxinas se reprimieron 3 genes codificantes de una triptófano sintasa (FvH4\_6g45680.1) ( $\log_2$  fold change -1,2), de una arogenato deshidratasa (FvH4\_3g01940.1) ( $\log_2$  fold change -1,8) y de una antranilato sintasa (FvH4\_4g33060.1) ( $\log_2$  fold change -1), y se sobreexpresó un gen codificante de otra antranilato sintasa (FvH4\_7g24230.1) ( $\log_2$  fold change 1,9) (Figura Suplementaria 2.2). En la ruta biosintética de las giberelinas de los frutos de la línea *FaNAC3* 3 se mostró una sobreexpresión de tres genes codificantes de enzimas tipo giberelina 2- $\beta$ -dioxigenasa (FvH4\_3g16760.1, FvH4\_4g20730.1 y FvH4\_3g38920.1), enzimas que se encargan de catabolizar la forma activa GA<sub>4</sub> (Figura Suplementaria 2.3). En la síntesis de ABA, a través de la síntesis de carotenos, lo más destacable fue la sobreexpresión de un gen codificante de una enzima ácido abscísico 8'-hidroxilasa (FvH4\_2g06010.1) ya que mostró un  $\log_2$  fold change de 6. También se registraron alteraciones menos importantes como la sobreexpresión de otro gen codificante de otra ácido abscísico 8'-hidroxilasa (FvH4\_2g34420.1) y una represión del gen codificante de la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 2 (NCED2) (FvH4\_3g05440.1), ambos con un  $\log_2$  fold change de -0,6 (Figura Suplementaria 2.4). La biosíntesis de etileno mediante el metabolismo de la cisteína y la metionina sufrió numerosas alteraciones en la expresión génica de sus enzimas, destacando una sobreexpresión elevada del gen codificante de la enzima encargada de transformar la L-homocisteína a L-metionina (FvH4\_4g00800.1) con un  $\log_2$  fold change de 4,3 y destacando la sobreexpresión de 3 genes y la represión de 1 codificantes de enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (FvH4\_6g42090.1, FvH4\_3g01280.1 y FvH4\_1g07190.1) (FvH4\_5g38040.1), siendo esta enzima clave en al biosíntesis de etileno, mostrando los 3 un  $\log_2$  fold change de 1,3; 1,5; 1,4 y -1,7 (Figura Suplementaria 2.5). Los frutos de la línea *FaNAC3* 3 también mostraron alteraciones en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo del ácido  $\alpha$ -linolénico, que desemboca en la formación de ácido jasmónico, siendo en la etapa previa a la  $\beta$ -oxidación una represión generalizada, destacando una represión de un gen codificante de una aleno óxido ciclasa (FvH4\_6g45370.1) y 2 genes codificantes de 12-oxofitodienoato reductasa (FvH4\_1g08500.1 y FvH4\_5g32750.1) ( $\log_2$  fold change -4,1 y -1,1), y en menor medida 3 genes codificantes de enzimas linolato 9S-lipoxigenasa (FvH4\_6g34970.1, FvH4\_3g43530.1 y FvH4\_5g05680.1) ( $\log_2$  fold change -0,7; -1,4 y -0,9). Mientras que tras la  $\beta$ -oxidación se observó una sobreexpresión generalizada destacando la de el gen codificante de la jasmonato O-metiltransferasa (FvH4\_4g32960.1) con un  $\log_2$  fold change de 2,3 (Figura Suplementaria 2.6). En la biosíntesis de brasinoesteroides cabe destacar el aumento en la expresión de 4 genes codificantes de proteínas relacionadas con el citocromo P450 que es necesario para esta ruta (FvH4\_1g13420.1, FvH4\_7g24370.1, FvH4\_7g12310.1 y FvH4\_7g28450.1) (Figura Suplementaria 2.7).

La vía de los fenilpropanoides/flavonoides mostró numerosas alteraciones en los frutos de la línea *FaNAC2* 11, destacando una sobreexpresión de un gen codificante de una enzima de la familia 4-coumarato CoA ligasa (FvH4\_6g27940.1) ( $\log_2$  fold change 2,5). Además, se registraron pequeñas reducciones en la expresión de 3 genes, uno de ellos codificante de la enzima fenilalanina amonio liasa 1 (PAL1) (FvH4\_7g19130.1) ( $\log_2$  fold change -0,8) y otros dos genes codificantes de enzimas de la familia 4-coumarato CoA ligasa (FvH4\_4g09340.1 y FvH4\_5g23550.1) ( $\log_2$  fold change -0,7 y -0,9) (Figura 2.20). En el metabolismo de los flavonoides de los frutos de *FaNAC2* 11

se mostró una reducción de la expresión del gen codificante de la enzima naringenina 2-oxoglutarato 3-dioxigenasa (FvH4\_1g11810.1), así como una represión de dos genes codificantes de la enzima antocianidina 3-O-glucosiltransferasa (FvH4\_1g13970.1 y FvH4\_7g33840.1) ( $\log_2$  fold change -4,1 y -0,6), involucrada en la síntesis de las antocianinas, principal tipo de pigmento en fresa. Además, 2 genes codificantes de varias enzimas relacionadas con la biosíntesis del precursor de las ligninas, caffeoyl-CoA, fueron sobreexpresados (FvH4\_4g24660.1 y FvH4\_6g28410.1) ( $\log_2$  fold change 1,6 y 1). Sin embargo, los genes codificantes de la enzima caffeoyl-coA O-metiltransferasa (FvH4\_1g13960.1) y flavonoides 3', 5' metiltransferasa (FvH4\_5g35170.1) fueron reprimido y sobreexpresado respectivamente, estando ambas involucradas en el paso de caffeoyl-coA a feruloyl-CoA (Figura 2.21).

La biosíntesis de las antocianinas por la vía de los fenilpropanoides/flavonoides sufrió menos alteraciones génicas en la línea FaNAC3 3 que las comentadas en la línea FaNAC2 11. En la ruta biosintética de los fenilpropanoides se puede destacar la sobreexpresión de dos genes codificantes de enzimas de la familia 4-coumarato CoA ligasa (FvH4\_5g23550.1 y FvH4\_3g30980.1) ( $\log_2$  fold change 1,3 y 1) (Figura 2.20) y en la ruta biosintética de los flavonoides una sobreexpresión (FvH4\_4g24660.1) ( $\log_2$  fold change 3,5) y una represión (FvH4\_6g28410.1) ( $\log_2$  fold change -1,4) de genes codificantes de deacetilvindolina O-acetiltransferasa y shikimato O-hidroxicinamoil transferasa respectivamente, estando ambas enzimas involucradas en la síntesis de cafeoil-CoA (Figura 2.21).

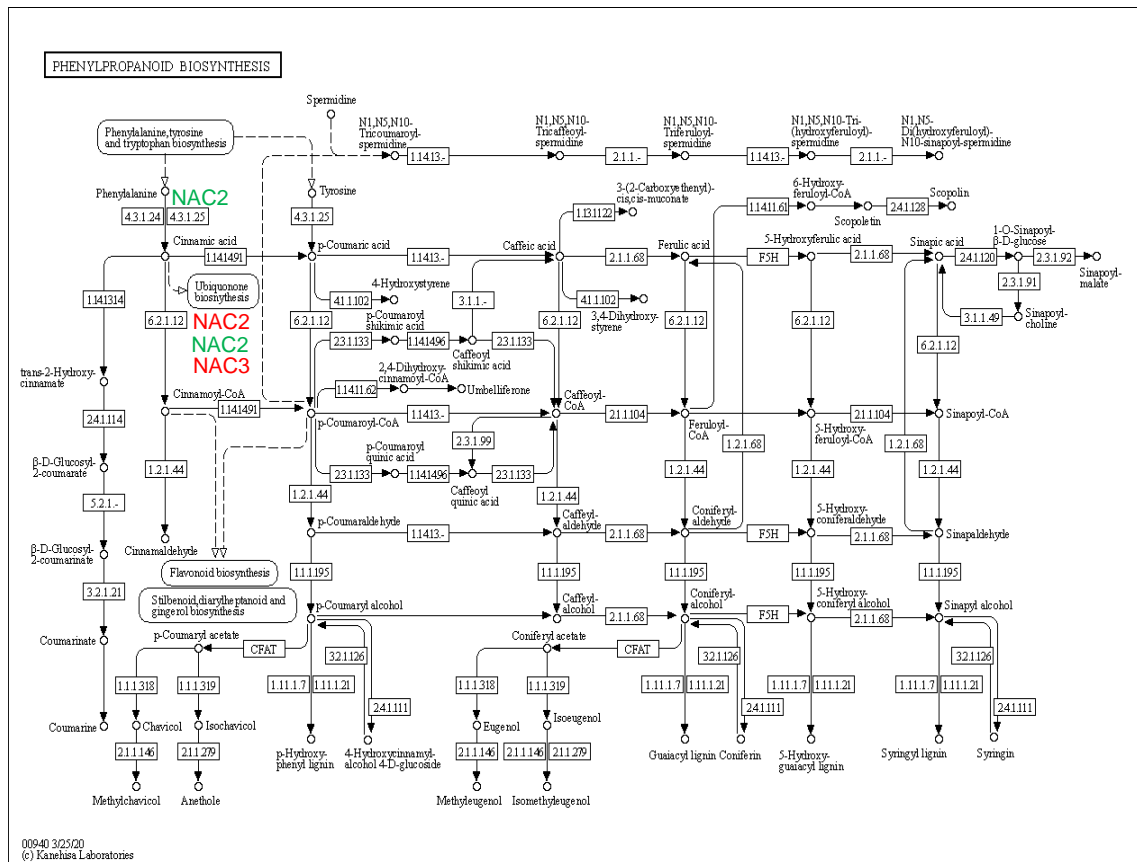


Figura 2.20: Alteraciones en la expresión génica de la ruta biosintética de los fenilpropanoides en frutos de la línea FaNAC2 11 (NAC2) y FaNAC3 3 (NAC3) en un mapa metabólico extraído

de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.

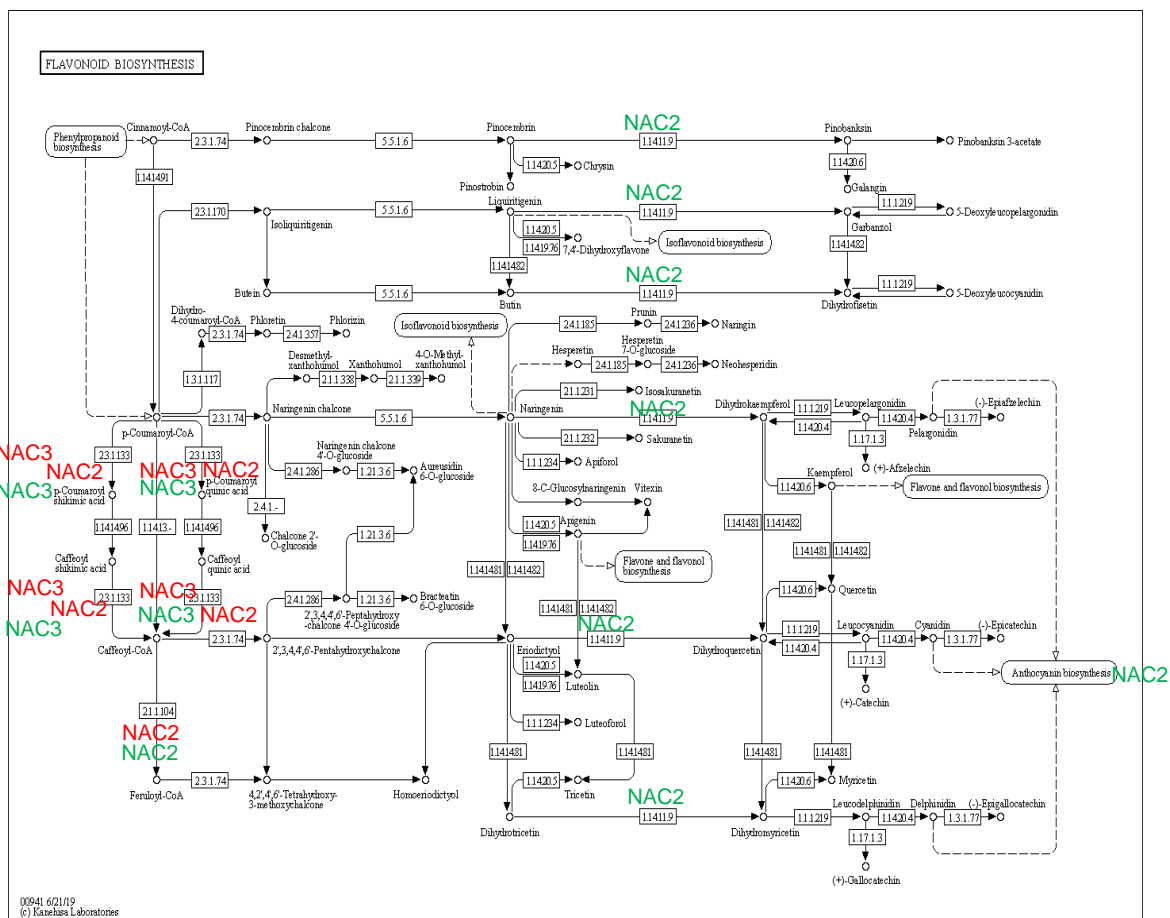


Figura 2.21: Alteraciones en la expresión génica de la ruta biosintética de los flavonoides en frutos de la línea *FaNAC2* 11 (*NAC2*) y *FaNAC3* 3 (*NAC3*) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.

Los frutos de la línea 11 con *FaNAC2* silenciado también mostraron alteraciones en la expresión de genes involucrados en la capacidad redox de las células. Mostraron un aumento en la expresión genes *FtsH* (*FvH4\_6g48450.1*) involucrada en la reparación de la proteína D1 del fotosistema II y de *CAT1* codificante de la enzima catalasa 1 detoxificadora de ROS (*FvH4\_3g09930.1*). La línea *FaNAC3* 3 también mostró alteraciones en la expresión de proteínas involucradas en la capacidad redox de la célula, mostrando una reducción en la expresión del gen codificante de una probable proteína *PRX* (*FvH4\_1g18230.1*) y otro codificante de una proteína *CSD2* (*FvH4\_3g30620.1*) (Figura Suplementaria 2.17).

Otro aspecto a destacar es que en los frutos de la línea *FaNAC2* 11 se han dado alteraciones en la expresión de numerosos genes codificantes de proteínas que influyen en la estructura y propiedades de la pared celular. Los cambios en la expresión génica afectaron a proteínas de diferentes familias siendo los principales

cambios, una represión de 2 genes codificantes de enzimas del tipo endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (FvH4\_5g03220.1 y FvH4\_3g23380.1) cuya acción rompe las microfibrillas de celulosa, de 3 genes que pueden codificar  $\beta$ -galactosidasas (FvH4\_1g26380.1, FvH4\_4g10980.1 y FvH4\_2g27470.1) que despolimerizan los galactanos de las ramificaciones de RG-1, de 1 gen codificante de una posible pectin metil esterasa (PME) (FvH4\_4g33950.1) que desesterifican al HG y de otro gen que codifica a posible expansina (FvH4\_5g14760.1) que parecen favorecer la ruptura de uniones entre y con la celulosa. Además, se sobreexpresó 1 gen que expresa una posible enzima sintetizadora de celulosa (FvH4\_2g36610.1), de un gen que expresa una posible endoglucanasa (FvH4\_2g25990.1), de 11 genes que podrían codificar enzimas del tipo XTH (FvH4\_1g18550.1, FvH4\_3g00840.1, FvH4\_3g00850.1, FvH4\_3g02630.1, FvH4\_4g12960.1, FvH4\_4g22090.1, FvH4\_4g34630.1, FvH4\_6g16550.1, FvH4\_6g38150.1, FvH4\_6g38160.1 y FvH4\_6g43860.1) que pueden romper las cadenas formadas por los xiloglucanos (XG), un gen que codifica una probable arabinofuranosidasa (FvH4\_3g43250.1) involucrada en la despolimerización de arabinanos, 3 genes codificantes de probables PME (FvH4\_1g09560.1, FvH4\_4g20180.1 y FvH4\_7g11320.1), 1 gen codificante de posible PL (FvH4\_6g52190.1), 1 gen que codifica una posible expansina (FvH4\_2g16110.1), 4 genes codificantes de posibles *plasmodesmata callose-binding protein* (PDCB) (FvH4\_3g00570.1, FvH4\_3g06030.1, FvH4\_6g01600.1 y FvH4\_6g38290.1) cuya acción favorece la deposición de calosa en la pared celular y 2 genes codificantes de posibles AGP de tipo FASCICLIN (FvH4\_1g03420.1 y FvH4\_7g12120.1) que podrían provocar cambios en la pared celular (Tabla 2.9).

Los frutos de la línea 3 con *FaNAC3* silenciado también mostraron alteraciones en la expresión de genes codificantes de proteínas cuya expresión influye en las características y composición de la pared celular siendo numerosas las familias de proteínas afectadas. Mostraron una disminución en la expresión: 1 gen codificante de una posible XTH (FvH4\_3g00850.1), otro codificante de una posible  $\beta$ -galactosidasa (FvH4\_4g10980.1), 3 genes codificantes de posibles PME (FvH4\_4g33970.1, FvH4\_5g35590.1 y FvH4\_7g11320.1), 3 genes que codifican a posibles expansinas (FvH4\_3g36410.1, FvH4\_3g40360.1 y FvH4\_5g14760.1) y 1 gen que codifica una posible AGP de tipo FASCICLIN (FvH4\_1g03420.1). En cuanto a los genes que vieron aumentada su expresión: 3 son codificantes de posibles celulosa sintasa (FvH4\_3g42760.1, FvH4\_3g42800.1 y FvH4\_6g42800.1), 1 es codificante de una probable endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (FvH4\_2g03820.1), 2 codifican a posibles XTH (FvH4\_1g18550.1 y FvH4\_5g23180.1), 4 son codificantes de probables PG (FvH4\_3g01620.1, FvH4\_4g18930.1, FvH4\_4g20990.1 y FvH4\_7g02910.1), 1 codifica a posible  $\beta$ -galactosidasas (FvH4\_6g33260.1), 2 a posibles PME (FvH4\_1g06980.1 y FvH4\_7g08770.1), 1 es codificante de probable PDCB (FvH4\_3g06030.1) y 1 codificante de probable AGP de tipo FASCICLIN (FvH4\_7g12120.1) (Tabla 2.9).

Tabla 2.9: Número de posibles enzimas que han visto alterada de forma significativa su expresión génica en las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3, tras FDR (Benjamini y Hochberg) ( $p < 0,05$ ).

	<i>FaNAC2</i> 11		<i>FaNAC3</i> 3	
	Baja expresión	Alta expresión	Baja expresión	Alta expresión
Celulosa sintasa	0	1	0	3
Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa	2	1	0	1
Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa	0	11	1	2
Poligalacturonasa	0	0	0	4
$\beta$ -galactosidasa	3	0	1	1
Arabinofuranosidasa	0	1	0	0
Pectin metil esterasa	1	3	3	2
pectato liasa	0	1	0	0
Expansina	0	1	3	0
Plasmodesmata callose-binding protein	0	4	0	1
AGP tipo FASCICLIN	0	2	1	1

Cabe destacar que los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron alteraciones en la expresión de diferentes FTs, destacando *FaNAC042* (FvH4\_4g23130.1) estudiado como *FaNAC3* en esta tesis ( $\log_2$  fold change -1,9) y *FaMYB10* (FvH4\_1g22020.1) involucrado en el aumento de pigmentación durante la maduración ( $\log_2$  fold change -1,1). Los frutos de la línea *FaNAC3* 3 mostraron una alta represión de los genes codificantes de las dos probables isoformas del FT WRKY40 (FvH4\_2g41070.1 y FvH4\_2g41060.1) relacionado en *Arabidopsis* con respuesta frente a estrés biótico y abiótico mediante el ABA (Chen et al., 2010). Además, hubo una reducción en la expresión del gen de WRKY70, FT también relacionado con la defensa frente a patógenos en *Arabidopsis* (Hu et al., 2012). Así mismo, mostraron sobreexpresión de un gen codificante de un FT MYB 305 (FvH4\_6g50930.1) relacionado con la activación de la biosíntesis de los fenilpropanoides a través de la enzima PAL (Ambawat et al., 2013).

### II.3.8 Caracterización de la pared celular de frutos maduros con *FaNAC2* y *FaNAC3* silenciado

Se extrajo la pared celular de los frutos de las líneas 11 y 12 con *FaNAC2* silenciado y de las líneas 3 y 10 de *FaNAC3* silenciado, para estimar la proporción mg de pared celular/g de peso fresco del receptáculo. De las 2 líneas *FaNAC2* analizadas se extrajo más cantidad de pared celular por gramo de receptáculo que de los frutos control. *FaNAC3* sin embargo, mostró resultados más ambiguos, ya que la línea 3 mostró más cantidad de pared que los frutos control y que las líneas *FaNAC2*, sin embargo, la línea 10 fue la línea con menor proporción de pared celular, menos incluso que los frutos control (Figura 2.22).

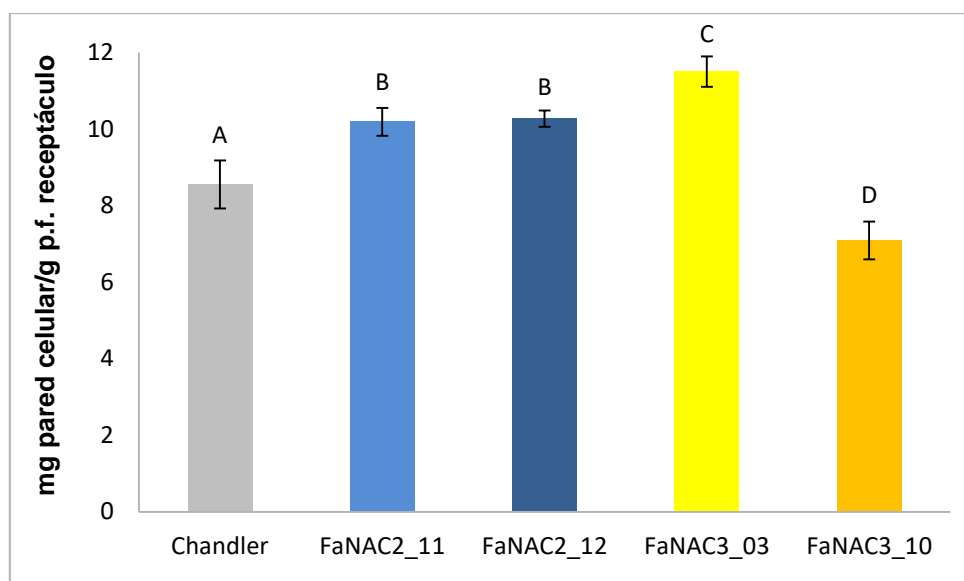


Figura 2.22: Proporción de pared celular de los frutos analizados con respecto al peso fresco de sus receptáculos, expresado en mg/g. Los grupos con la misma letra no mostraron diferencias significativas según un test HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ensayos inmunológicos frente a epitopos de pared celular revelaron que los frutos de las líneas FaNAC2 mostraron algunas diferencias en su composición con respecto a los frutos control (Figura 2.23). En todas las fracciones de las paredes celulares de los frutos de ambas líneas FaNAC2 se registraron cambios con respecto a las de los frutos control, destacando: en la fracción agua (pectinas y componentes solubilizados), un aumento de HG, siendo mayor el aumento en los frutos de la línea 11 con epitopos no esterificados, y en los procedentes de la línea 12 con epitopos acetilados. La cantidad de XG con epitopos galactosilados también fue mayor en los frutos de ambas líneas, pero especialmente en los de la 12. Los frutos de la línea 11 mostraron una cantidad mucho menor con respecto a los frutos control de ramificaciones de arabinanos del ramnogalacturonano I (RG-1). La cantidad de señal detectada por el anticuerpo específico de calosa (10H2D12) también fue ligeramente superior en frutos de ambas líneas transgénicas con respecto a los frutos control. En la fracción CDTA (pectinas retenidas por fuerzas iónicas), los frutos que mostraron mayores diferencias fueron los procedentes de la 11, siguiendo la misma tendencia que en la fracción agua, un aumento importante de epitopos no esterificados de homogalacturonanos y una disminución de arabinanos en las ramificaciones de RG-1. En la fracción carbonato (pectinas unidas fuertemente a la pared celular primaria) frutos de ambas líneas transgénicas mostraron menos cantidad de regiones no esterificadas de HG. También mostraron menos cantidad de RG-1 y de los galactanos que ramifican este polisacárido. Además, los frutos de la línea 11 tuvieron menos cantidad de ramificaciones de RG-1 en forma de arabinanos. Frutos de ambas líneas tuvieron menos cantidad de AGP. En la fracción KOH 4 M (pectinas y elementos unidos a la celulosa y gran cantidad de celulosa) los frutos de la línea 11 mostraron menos cantidad de RG-1 y de sus ramificaciones en forma de arabinanos, sin embargo, tuvo un aumento de las ramificaciones de galactanos. Los frutos de la línea 12 sin embargo, mostraron un aumento de HG no esterificados, de ramificaciones de

arabinanos de RG-1 y de XG galactosilados. Frutos de ambas líneas mostraron un aumento de galactanos del esqueleto de RG-1, siendo más importante el aumento en frutos de la línea 12. Diferencias importantes fueron detectadas en la cantidad calosa de frutos de ambas líneas transgénicas, siendo mayor en los frutos transgénicos que la registrada en los frutos control.

Al tratar con celulasa el residuo tras el fraccionamiento, se degradan las microfibrillas de celulosa y se liberan pectinas que estaban atrapadas. En este tratamiento los cambios entre los frutos de las líneas *FaNAC2* y los de la línea control fueron muy sutiles. Hubo un aumento en los galactanos del esqueleto de RG-1 en los frutos de ambas líneas, y también un aumento de XG galactosilados y de AGP. Los frutos de la línea 11 mostraron un ligero aumento en el esqueleto de RG-1 y ramificaciones de galactanos, mientras que los de la línea 12 mostraron un ligero descenso del esqueleto RG-1 y un aumento de las ramificaciones de arabinanos. En el tratamiento de la pared celular sin fraccionar con celulasa los frutos de la línea 11 mostraron un aumento de HG no esterificado, de galactanos en el esqueleto y ramificaciones de RG-1 y una importante disminución de arabinanos ramificando RG-1. Los frutos de la línea 12 por su parte solo mostraron un ligero descenso de HG esterificados.

Los frutos de las líneas *FaNAC3* también mostraron diferencias en la composición de sus paredes celulares con respecto a los frutos control, aunque en líneas generales menores que los frutos de las líneas *FaNAC2* (Figura 2.23). Se registraron cambios en todas las fracciones de las paredes celulares destacando: en la fracción agua de los frutos de la línea 10 un ligero aumento en la cantidad de galactanos del esqueleto y de las ramificaciones de RG-1 y en la cantidad de AGP. Frutos de la línea 3 apenas variaron con respecto a los frutos control en esta fracción. En la fracción CDTA apenas hubo cambios, los frutos de la línea 3 mostraron una disminución de HG esterificados y no esterificados, además de un ligero aumento en la cantidad de esqueleto RG-1. En la fracción carbonato frutos de ambas líneas transgénicas mostraron una ligera disminución de arabinanos unidos a RG-1. Además, los frutos de la línea 3 mostraron una menor cantidad de galactanos ramificando RG-1. En la fracción KOH 4 M hay un ligero aumento, en frutos de ambas líneas transgénicas, de galactanos ramificando RG-1. Los frutos de la línea 3 tuvieron un pequeño aumento en XG, mientras que los de la línea 10 el aumento lo mostraron en la cantidad de galactanos del esqueleto de RG-1 y en la cantidad de AGP.

En el tratamiento con celulasa los frutos de la línea 10 tuvieron más cambios en la composición, con un ligero aumento de galactanos en el esqueleto y en las ramificaciones de RG-1, de XG galactosilado y de AGP, mientras que los de la línea 3 tuvieron una ligera disminución de arabinanos unidos a RG-1. Al tratar las paredes celulares sin fraccionar con celulasa los cambios más importantes se dieron en frutos de la línea 10, aumentando la señal de galactanos en las ramificaciones de RG-1 y de AGP. Los frutos de la línea 3 por su parte mostraron un ligero descenso en la señal de HG esterificados y no esterificados.



Figura 2.23: Representación de los valores obtenidos mediante ELISA usando diferentes anticuerpos monoclonales con epitopos en la pared celular, en la pared celular fraccionada de frutos de líneas FaNAC2 y FaNAC3. Cuanto más oscuro el verde, más señal en ELISA, por el contrario, más claro indica una señal menor.

Se hizo una separación por cromatografía de intercambio aniónico de las fracciones KOH 4 M procedentes de los frutos de las líneas FaNAC2 y FaNAC3, además de la control. Tras separar dichas fracciones se hicieron análisis ELISA con anticuerpos monoclonales con epitopos de pared celular diferentes (Figura 2.24). De esta forma, se puede complementar la información obtenida en los inmunoensayos anteriores. Tras pasar las fracciones KOH 4 M por las columnas de intercambio aniónico, tan solo los frutos de las líneas FaNAC2 mostraron diferencias importantes con respecto a los frutos control, siendo los procedentes de la línea 12 los más interesantes. Estos frutos mostraron una mayor cantidad de HG parcialmente metilado/no esterificado, y las ramificaciones de RG-1 también se vieron alteradas ya que mostraron más cantidad de arabinanos. Además, el esqueleto de RG-1 tuvo una mayor cantidad de galactanos. También se vio un ligero aumento del esqueleto de RG-1, de galactanos en las ramificaciones de RG-1 y de AGP. Los frutos de la línea 11 por su parte mostraron también más cantidad de galactanos en el esqueleto de RG-1. Además, frutos de ambas líneas FaNAC2 mostraron un aumento importante en la cantidad de calosa con respecto a los frutos de las líneas FaNAC3 y de la línea control. Todos estos cambios

comentados, se dieron en la fracción neutra de la muestra (antes de que se inyectara NaCl en la columna).

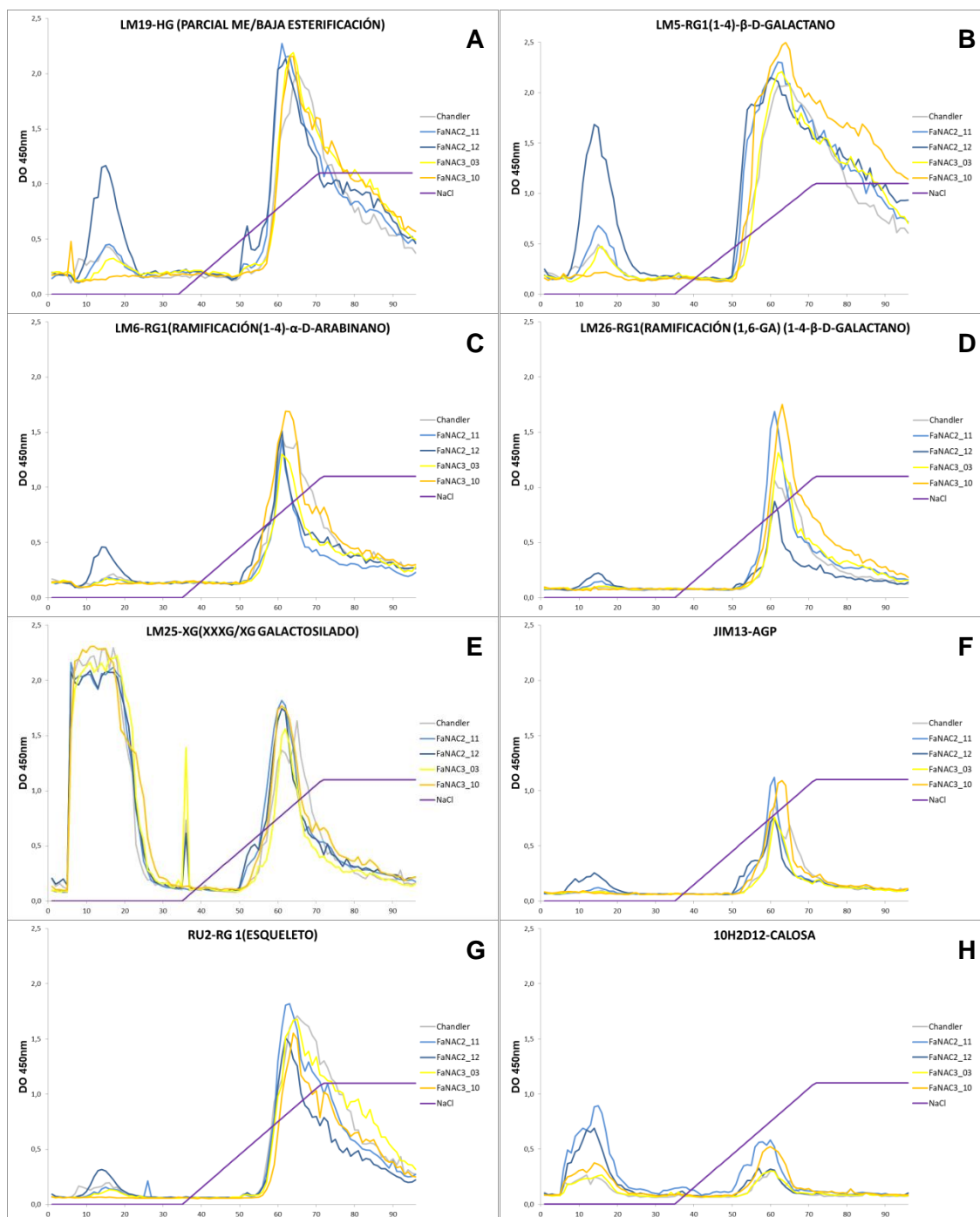


Figura 2.24: Cantidad de homogalacturonano parcialmente metilado/bajo grado de esterificación (A), (1-4)-β-D-galactano en ramnogalacturonano 1 (B), ramificaciones (1-4)-α-D-arabinanos en ramnogalacturonano 1 (C), ramificaciones (1,6-GA)(1-4-β-D-galactano) en ramnogalacturonano 1 (D) motivo XXXG/XG galactosilado en xiloglucanos (E), proteínas arabinogalactanos (F), esqueleto de ramnogalacturonano 1 (G) y calosa (H) detectada con los anticuerpos LM19, LM5, LM6, LM26, LM25, JIM13, RU2 y 10H2D12 respectivamente, en la fracción KOH 4 M de los frutos control, líneas 11 y 12 de FaNAC2 y 3 y 10 de FaNAC3 tras ser separadas por cromatografía de intercambio aniónico.

## II.4 Discusión

### II.4.1 Influencia de *FaNAC2* y *FaNAC3* en el tamaño del fruto

Se caracterizaron frutos procedentes de plantas de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' con el gen *FaNAC2* (frutos *FaNAC2*) y el gen *FaNAC3* silenciado (frutos *FaNAC3*), comparándolos con frutos control no transgénicos.

Se comparó el fenotipo de 3 líneas independientes con el gen *FaNAC2* silenciado, mientras que con el gen *FaNAC3* fueron 2 las líneas analizadas. Todas las líneas analizadas mostraron más de un 75 % de silenciamiento de su gen respectivo. Todas las líneas, tanto *FaNAC2* como *FaNAC3*, produjeron frutos más pequeños que los frutos control, viéndose reflejado en una disminución del peso y de la longitud del ancho y largo del fruto. En los frutos de ambas líneas se detectaron alteraciones en la expresión de numerosos genes, pudiendo ser la causa de dicha reducción de tamaño muy diversa.

La auxina, está ampliamente aceptado, juega un papel fundamental en la división celular temprana de los frutos, siendo esta división determinante para el tamaño de los frutos (Liu et al., 2018; Pandolfini et al., 2007; Pattison et al., 2014; Ruan et al., 2012). La ruta de señalización de la auxina está basada en la unión de auxina a receptores TIR1, que forman parte del complejo SCF<sup>TIR1</sup> junto con una ubiquitina (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski y Leyser, 2005). Cuando se produce esta unión, se induce la poliubiquitinación y degradación en proteasomas de proteínas represoras Aux/IAA (ácido indol-3-acético) (Benjamins y Scheres, 2008; Calderón-Villalobos et al., 2012). Al eliminarse estas proteínas represoras, factores transcripcionales de tipo ARF se unen en la región promotora de genes dependientes de auxina (Weijers y Wagner, 2016). Hay 3 familias de genes, que parecen estar involucrados en la respuesta frente a auxina, ya que son activados rápidamente tras la exposición a esta hormona: la familia *SMALL AUXIN UP RNAs* (SAURs) (Ren y Gray, 2015), GH3 y AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) (Hagen y Guilfoyle, 2002; Woodward y Bartel, 2005). Los frutos *FaNAC2* de la línea 11 mostraron en la secuenciación del ARN, alteraciones en la expresión de numerosos genes involucrados en la ruta de señalización por auxinas. Hubo un silenciamiento generalizado de genes de rápida respuesta a auxina, 5 genes de la familia SAUR y 1 de la familia Aux/IAA, sugiriendo una represión en la respuesta producida por la auxina. Esto se acompaña con el silenciamiento de 3 genes involucrados en la biosíntesis de triptófano, siendo uno de ellos codificante de una enzima fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa, que cataliza la reacción en que la D-eritrosa 4-fosfato, procedente de la ruta de las pentosas fosfatos y de la fotosíntesis, se incorpore en la ruta biosintética de fenilalanina, tirosina y triptófano (Sasso et al., 2009). Aunque la represión de este gen no es muy acusada también hay una reducción en la expresión de un gen codificante de una enzima antranilato sintasa, responsable de sintetizar antranilato, precursor del indol y del triptófano. Hay dos rutas fundamentales en la síntesis de auxina, una dependiente de triptófano y otra independiente, siendo aceptado que la ruta predominante en plantas es dependiente de triptófano, teniendo como intermediario el ácido indol-3-pirúvico (Brumos et al., 2014). En los primeros pasos, el triptófano es convertido a ácido indol-3-pirúvico por la triptófano aminotransferasa (Stepanova et al., 2008), enzima codificada por un gen que también muestra una leve represión en los frutos de la línea *FaNAC2* 11. Todo

esto sugiere una represión de procesos relacionados con la auxina, ya que tanto la biosíntesis (mediante la reducción en la síntesis de triptófano y de su metabolismo) como genes efectores se vieron reprimidos. Estos resultados indican que una posibilidad de la reducción de tamaño en los frutos con el gen *FaNAC2* silenciado se pueda deber a una reducción de la acción de la auxina, implicada en procesos de división y expansión celular, teniendo una gran influencia en el tamaño del fruto (Estrada-Johnson et al., 2017).

Otra vía de señalización alterada en frutos *FaNAC2* fue la de las hormonas giberelinas. En dicha ruta intervienen los receptores de núcleo GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1), que al unirse una forma bioactiva de giberelina ( $GA_1$ ,  $GA_3$  o  $GA_4$ ), cambia de conformación y se une a proteínas DELLA, originando en ellas una poliubiquitinación y su posterior degradación en proteasomas, siendo estas proteínas DELLA reguladores negativos (Harberd et al., 2009; Zentella et al., 2007). Los frutos transgénicos *FaNAC2* mostraron una sobreexpresión notable de un gen que expresa un represor DELLA, lo cual nos sugiere una posible represión de la vía de actuación mediante esta hormona. Además, la ruta de biosíntesis de giberelinas también se vio alterada, ya que hay una represión del gen *FaGA3ox*, codificante de la enzima giberelina 3- $\beta$ -dioxigenasa, imprescindible para sintetizar la forma activa  $GA_4$  y un aumento en la expresión de un gen que codifica una giberelina 2- $\beta$ -dioxigenasa (*GA2ox*) encargada del catabolismo de la forma activa  $GA_4$  (Csukasi et al., 2011). Se ha comprobado que la máxima expresión de esta enzima se da en flor y en estadio verde de receptáculo de fresa, disminuyendo drásticamente en estadio blanco, dejando entrever que la biosíntesis de GA activas es importante para las etapas del fruto donde las células están en expansión (Csukasi et al., 2011). Además, en este trabajo, se comprobó que la forma activa de giberelina más abundante en fruto de fresa era  $GA_4$  y que podría jugar en papel importante en la expansión celular durante el estadio blanco, al igual que lo juega en la expansión celular del fruto de tomate (Lemaire-Chamley et al., 2005). Por ello, el silenciamiento de *FaGA3ox* junto con el aumento de expresión de *GA2ox* debe de estar afectando al nivel de giberelinas en su forma activa, y por tanto, podría haber una reducción de la expansión celular, y por consiguiente, en el tamaño de fruto. Esto concuerda con los resultados comentados en el caso de la auxina, ya que es conocido que la división y expansión celular en fruto, es debido a una acción coordinada de ambas hormonas (Csukasi et al., 2011; de Jong et al., 2009; McAtee et al., 2013; Serrani et al., 2007, 2008; Thompson, 1969).

En el caso de la línea *FaNAC3* 3, la vía de señalización de la auxina no mostró una tendencia tan clara de represión, ya que se sobreexpresó un gen codificantes de FTs tipo ARF (moduladores positivos) mientras que vieron reducida su expresión 2 genes codificantes de proteínas efectoras AUX/IAA. En la ruta de biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano se observaron pequeñas represiones de 3 genes codificantes de triptófano sintasa y de 2 genes que codifican las enzimas que sintetizan fenilalanina, tanto por la vía de L-arogenato (arogenato deshidratasa) como la de fenilpiruvato (antranilato sintasa), aunque también hubo un leve aumento en la expresión un gen codificante de otra antranilato sintasa. Esto nos indica que a diferencia de la línea *FaNAC2* 11, la línea *FaNAC3* 3 no mostró una tendencia tan clara ni en la biosíntesis ni en la vía de acción de la auxina.

En cuanto a las giberelinas, a diferencia de la línea *FaNAC2* 11, esta línea de *FaNAC3* no mostró alteraciones importantes en la vía de señalización, sin embargo, el balance de la forma activa  $GA_4$  si parece estar afectado, ya que mostró un aumento de expresión importante en 3 genes codificantes de enzimas catabolizadoras de  $GA_4$  de tipo *GA2ox*. Esto sugiere que ambos *FaNAC* regulan la cantidad de  $GA_4$  de forma diferente, mientras que la línea *FaNAC2* 11 mostró una represión de la síntesis y una sobreexpresión del catabolismo, en la línea *FaNAC3* 3 solo parece estar favorecido el catabolismo de esta forma activa de giberelina, siguiendo en ambos casos la misma tendencia, menos cantidad de giberelina en forma activa. Por todo ello, parece más probable que los frutos de las líneas *FaNAC3* sean más pequeños por el aumento del catabolismo de  $GA_4$ , mientras que en los frutos *FaNAC2* podría ser causado por las alteraciones en la biosíntesis y señalización comentadas en ambas hormonas.

En *Arabidopsis* ya se ha reportado un FT NAC que parecen estar involucrado en la vía de señalización mediada por auxina, en la formación y desarrollo de raíces laterales, actuando aguas abajo de *TIR1* (Xie et al., 2000). En fruto de tomate también se ha propuesto otro FT NAC como activador de la vía de acción mediante auxina, *SNAC4*, que podría ser clave en la respuesta cruzada entre auxina y etileno mediante el gen codificante de *LeEIN2* (Kou et al., 2016). Nuestros resultados sugieren un posible papel de *FaNAC2* en la regulación de la acción mediada por auxina, actuando como activador de proteínas efectoras tipo *Aux/IAA* y *SAUR*, y pudiendo también promover la biosíntesis de auxina activando enzimas clave en la ruta biosintética de la fenilalanina, tirosina y triptófano en el fruto de fresa. Esta hipótesis, aún sin suficientes evidencias, sería interesante de seguir estudiándola en mayor profundidad realizando ensayos de expresión mediante qPCR y comprobando posibles interacciones físicas con promotores de genes clave mediante el sistema de doble híbrido en levadura.

También hay trabajos que relacionan FTs NAC con la vía de señalización mediada por giberelinas. En *Arabidopsis* se ha demostrado que un FT NAC está involucrado en la regulación de la germinación de semillas mediante la señalización de giberelinas en condiciones de alta salinidad (Kim et al., 2010). Otro trabajo en *Arabidopsis* sugirió que un FT NAC promovía la expresión de la enzima catabolizadora *GA2ox* como respuesta a estrés abiótico por sequía o frío (Chen et al., 2019). En arroz se ha comprobado que *NAC 29* y *NAC 31*, relacionados con la biosíntesis de celulosa, interaccionan con proteínas represoras *DELLA* de la respuesta mediada por giberelinas, reprimiéndose ambos FTs y reduciéndose la biosíntesis de celulosa (Huang et al., 2015). Que sepamos no se ha descrito en fruto una posible regulación de la ruta mediada por giberelinas a través de FTs NAC. Nuestros resultados abren una posible vía para futuras investigaciones sugiriendo un posible control de *FaNAC2* y *FaNAC3* en los niveles de la forma activa  $GA_4$  reprimiendo la expresión de la enzima catabólica *GA2ox*, y en el caso de *FaNAC2* también activando la transcripción de la enzima biosintetizadora *GA3ox*.

#### II.4.2 Posible papel de *FaNAC2* y *FaNAC3* en la acumulación de pigmentos y de azúcares en el fruto de fresa durante la maduración

Los frutos de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC2* 12 mostraron un retraso y una maduración irregular e incompleta, acumulándose los pigmentos en la parte apical quedando la zona basal blanca. Esta maduración irregular por zonas es mostrada en las imágenes de los frutos de ambas líneas *FaNAC2* cortados longitudinalmente ya que a pesar de mostrar signos de sobremaduración, las médulas de los frutos transgénicos estaban más blanquecinas. En el caso de los frutos de las líneas *FaNAC3* mostraron una pigmentación homogénea, siendo en el caso de *FaNAC3* 3 mayor en todas las variables de color analizadas y en el caso de *FaNAC3* 10 similar a los frutos control.

Los pigmentos mayoritarios en fresa que confieren el color rojo característico cuando el fruto está maduro son las antocianinas (Bakker et al., 1994). La biosíntesis de estos pigmentos depende de las rutas de los fenilpropanoides, de los flavonoides y de las antocianinas (Almeida et al., 2007; Fait et al., 2008; Griesser et al., 2008). Los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron alteraciones en la expresión génica de las 3 vías biosintéticas citadas, siendo los cambios más importantes una represión del gen codificante de la naringenina 2-oxoglutarato 3-dioxigenasa en la vía de los flavonoides y de un gen codificante de la antocianidina 3-O-glucosiltransferasa 2 en la ruta biosintética de las antocianinas. Sin embargo, los frutos analizados de la línea *FaNAC3* 3 no mostraron alteración en la expresión de ninguno de estos genes, aunque se observó una leve sobreexpresión de dos genes codificantes de enzimas de la familia 4-coumarato:CoA ligasa que actúan aguas abajo de la PAL en la vía de los fenilpropanoides (Hu et al., 1998). Given et al. (1988b) comprobaron que la acción correcta de la PAL en la biosíntesis de fenilpropanoides era necesaria para la pigmentación del fruto de fresa durante la maduración. En esta misma ruta, aunque no se hayan realizado pruebas funcionales, se han sugerido algunas enzimas de la familia 4-coumarato:CoA ligasa como candidatas a promover la pigmentación en frambuesa, también considerada como fruto no climatérico (Kumar y Ellis, 2003). También se ha comprobado que la oxidación del anillo central de la naringenina realizada por la naringenina 2-oxoglutarato 3-dioxigenasa en la biosíntesis de flavonoides es necesaria para conseguir una correcta pigmentación en el fruto de fresa (Härtl et al., 2017). Griesser et al. (2008) comprobaron que la enzima antocianidina 3-O-glucosiltransferasa apenas se expresaba en frutos de fresa en los primeros estadios de desarrollo. Sin embargo, coincidiendo con el comienzo de la pigmentación en el fruto la transcripción de esta enzima aumentaba drásticamente. Además, comprobaron que esta enzima es un punto clave para la canalización de los flavonoides a la biosíntesis de antocianinas, siendo una enzima fundamental para la pigmentación de la fresa durante la maduración. Los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico junto con los patrones de maduración observados en los frutos de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3 sugieren que *FaNAC2* podría estar involucrado en el aumento de pigmentación del fruto de fresa durante la maduración activando enzimas clave en las rutas biosintéticas de los fenilpropanoides, de los flavonoides y de las antocianinas, mientras que *FaNAC3* podría ser un represor de varias enzimas de la familia 4-coumarato:CoA ligasa cuyo silenciamiento provocó un aumento de color en frutos de la línea *FaNAC3* 3. El hecho de que los frutos de las líneas *FaNAC3* 3 y *FaNAC3* 10

no coincidan en la tendencia con respecto al color de frutos control, hace necesario un estudio mediante qPCR de este gen en diferentes líneas con *FaNAC3* silenciado y descartar que dicho cambio en la expresión haya sido producido por el proceso de la transformación genética y no por la ausencia de transcritos de *FaNAC3*. Estos resultados apuntan en la misma dirección que los descritos por Fu et al. (2016), donde en el fruto de papaya un FT NAC, CpNAC1, parece regular la maduración mediante la activación de la transcripción de enzimas biosintetizadoras de carotenoides. También se ha descrito en fruto de tomate y lichi la posibilidad de que FTs NAC regulen la pigmentación durante la maduración a través de la ruta biosintética de las antocianinas (Gao et al., 2018; Jiang et al., 2019; Gao et al., 2020).

Ya ha sido descrita en numerosos trabajos la posibilidad de que FTs tipo NAC puedan interactuar físicamente con otras proteínas, pudiendo ser de la misma familia NAC o no (Cong Jin et al., 2017; Yong et al., 2019; Yuan et al., 2019). Por esto, se hizo un ensayo de autoactivación en levadura, enfrentando ambos genes *FaNAC* de fresa contra una genoteca de expresión de frutos maduros, en busca de posibles interacciones proteicas físicas, tras ser expresadas en levadura. Debido a resultados positivos obtenidos con ambas proteínas *FaNAC2* y *FaNAC3*, de proteínas localizadas en la pared celular (apartado II.3.5), y a que hay descritos varios FTs de tipo NAC asociados a membrana que presentan un motivo transmembrana en la región C-terminal y cuya digestión proteolítica permite su activación y translocación al núcleo (Kim et al., 2016, 2010; Liang et al., 2015; Moyano et al., 2018; Puranik et al., 2012), se hizo una predicción de localización subcelular. En ambos casos, las predicciones mostraron una localización en el núcleo de la célula. Tras una confirmación de localización nuclear mediante transformación transitoria por biolística, se descartaron aquellas proteínas que dieron positivo en el ensayo de autoactivación cuya acción se realizara fuera del núcleo. De las proteínas que dieron positivo en el ensayo de autoactivación hay una especialmente interesante relacionada con el proceso de maduración de la fresa que podría interactuar con *FaNAC2*, *FaMYB10*.

*FaMYB10* es un FT que juega un papel clave en la producción de antocianinas regulando la expresión de enzimas en la vía de los fenilpropanoides y de los flavonoides (Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Hawkins et al., 2016; Zhang et al., 2017; Hua Wang et al., 2019). El silenciamiento de *FaMYB10* provocó en el fruto de fresa la represión de genes codificantes de la PAL y la antocianidina 3-O-glucosiltransferasa, además se redujo la producción del flavonoide naringenina (Medina-Puche et al., 2014), siendo el efecto similar al provocado en los frutos de la línea *FaNAC2* 11. Estas coincidencias sugieren que ambos FTs podrían actuar sinérgicamente, interactuando físicamente, promoviendo la producción de pigmentos en fruto de fresa durante la maduración, activando enzimas clave en la vía de los fenilpropanoides, de los flavonoides y de la biosíntesis de antocianinas. Estos resultados cogen fuerza con el hecho de que en fruto de fresa ya se ha descrito la posibilidad de que un FT de tipo MYB (*FaEOBII*) interactúe de forma física con otro FT (*FaDOF<sub>2</sub>*) para activar de forma sinérgica la producción de eugenol en la vía de los fenilpropanoides (Molina-Hidalgo et al., 2017). Para aportar más evidencias de esta posible interacción física entre *FaNAC2* y *FaMYB10* sería conveniente hacer un ensayo específico mediante el sistema de doble híbrido en levadura enfrentando ambos FTs.

Además, los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron una represión del 52 % de *FaMYB10*. Esto abre la posibilidad de otra forma de acción de *FaNAC2* sobre *FaMYB10*, uniéndose a su promotor y activando su transcripción, provocando con ello la producción de pigmentos en el fruto de fresa durante la maduración. Que un FT controle la transcripción de otro uniéndose al promotor ya ha sido descrito anteriormente, en concreto en arroz, se ha comprobado que FTs de la familia NAC pueden unirse al promotor de FTs de la familia MYB para activar su transcripción y promover la biosíntesis de pared celular secundaria (Ye et al., 2018). Por todo esto sería interesante ampliar el estudio de esta posibilidad analizando el promotor de *FaMYB10* y realizando un ensayo de interacción física mediante el sistema de doble híbrido en levadura para enfrentarlo con *FaNAC2*.

En definitiva, la maduración anómala observada en los frutos de las líneas con *FaNAC2* silenciado podría deberse a que *FaNAC2* active la producción de pigmentos durante la maduración de la fresa promoviendo la expresión de enzimas clave en las vías de fenilpropanoides, flavonoides y antocianinas a través de *FaMYB10*. Se han comentado dos posibilidades no excluyentes de esta interacción, siendo una la unión de *FaNAC2* al promotor de *FaMYB10* activando su transcripción, y por ende, la producción de pigmentos, y otra en la que *FaNAC2* se une físicamente a *FaMYB10* para activar de forma sinérgica la producción de pigmentos. Los frutos de las líneas con *FaNAC3* silenciado aumentan la pigmentación durante la maduración de forma homogénea, aunque las dos líneas transgénicas analizadas no presentaron la misma cantidad de color en las variables analizadas, siendo en los frutos de la línea *FaNAC3* 3 mayor que en los frutos control, mientras que los frutos de la línea *FaNAC3* 10 no mostraron diferencias significativas. Además, los frutos de la línea *FaNAC3* 3 no mostraron represión génica de enzimas clave en la biosíntesis de antocianinas por la vía de los fenilpropanoides y de los flavonoides, tan solo mostraron una sobreexpresión de 2 enzimas que intervienen en la vía de los fenilpropanoides, pudiendo ser esta la causa del aumento de color. Además, tampoco parece mostrar interacción con *FaMYB10*, pudiendo ser esta la causa de la diferencia observada en el patrón de maduración con respecto al de los frutos con *FaNAC2* silenciado. Estos resultados están en consonancia con los descritos en el fruto de la pera donde el FT PpNAC1 parece regular la maduración a través de la activación del FT PpMYB10.1 (Zhou et al., 2015), y con los descritos en el fruto de manzana donde el FT MdNAC42 promueve la biosíntesis de antocianinas por la vía de los fenilpropanoides interaccionando con MdMYB10 (Shuangyi Zhang et al., 2020).

Otro factor considerado determinante en la maduración del fruto de fresa es el aumento en los niveles de ABA, al que se le asume, entre otros, el papel de inducir genes codificantes de enzimas degradantes de la pared celular para su desensamblaje, y de enzimas encargadas de la síntesis de antocianos (Jia et al., 2016, 2011; Medina-Puche et al., 2016). El ABA es un carotenoide, y en su ruta biosintética, el primer paso específico es la epoxidación de zeaxantina y anteroxantina a violaxantina, siendo catalizado por una zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Marin et al., 1996; Xiong y Zhu, 2003). Esta violaxantina, se convierte en 9-cis-epoxicarotenoide, para luego ser sustrato de la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), que por escisión origina xantoxina (Schwartz et al., 1997). La xantoxina, tras la acción de una alcohol deshidrogenasa / reductasa (SDR) y de la enzima ABA aldehído oxidasa

(AAO), se transforma en ABA (Cheng et al., 2002; Xiong y Zhu, 2003). El paso catalizado por NCED es considerado un paso limitante en la síntesis de ABA (Tan et al., 1997). En la vía de señalización del ABA, actúan receptores tipo PYR, componentes reguladores RCAR, represores tipo PP2C y proteínas efectoras quinasas SnRK (relacionadas con la sacarosa) (Fujii et al., 2009; Fujii y Zhu, 2009; He et al., 2014; Li et al., 2013; Zhao et al., 2018). Estas quinasas fosforilan factores de transcripción ABF, que regulan genes controlados por ABA (Furhata et al., 2006).

La línea *FaNAC2* 11 produjo frutos que mostraron alteraciones importantes en la expresión génica de la ruta biosintética de los carotenoides siendo los más importantes una represión de la expresión de dos enzimas involucradas en los primeros pasos (fitoeno sintasa 2), donde se sintetiza el precursor fitoeno, a partir del cual se sintetizan todos los carotenoides, represión de dos genes codificantes de enzimas limitantes en la biosíntesis de ABA, NCED (*NCED1* y *NCED2*), represión de 3 genes codificantes de ácido abscísico 8' hidroxilasa y sobreexpresión de un gen codificante de otra ácido abscísico 8' hidroxilasa. Los frutos de la línea *FaNAC3* 3 también mostraron una alta sobreexpresión de un gen codificante de enzima ácido abscísico 8' hidroxilasa ( $\log_2$  fold change 6), y de forma muy leve una represión del gen codificante de la enzima NCED2 ( $\log_2$  fold change -0,6). Se ha demostrado en fresa que la represión de NCED provoca un retraso en la maduración (Jia et al., 2011). Además, se ha comprobado que la función de las enzimas ácido abscísico 8' hidroxilasa es la de inactivar el ABA, teniendo un papel antagónico a NCED (Liao et al., 2018). Los resultados del análisis transcriptómico respaldan el patrón de maduración anómalo observado en frutos de las líneas *FaNAC2* y la maduración homogénea presentada por los frutos de las líneas *FaNAC3* (pues la sobreexpresión de la ácido abscísico 8' hidroxilasa fue mucho mayor que la represión de *NCED2*). En fresa hay al menos 3 NCED diferentes (Ji et al., 2012; Kang et al., 2013; Yong Wang et al., 2017). Aunque se ha propuesto NCED2 (FvH4\_3g05440.1) como la principal enzima en la biosíntesis de ABA durante la maduración de la fresa debido a que su transcripción aumenta drásticamente cuando comienza la producción de pigmentos (Ji et al., 2012; Yong Wang et al., 2017), no se han realizado análisis funcionales. Sin embargo, Jia et al. (2011) hicieron un análisis funcional de *NCED1* (FvH4\_3g16730.1) en *F. x ananassa* mediante agroinfiltraciones de ARNi, y comprobaron que el silenciamiento de este gen provocaba una maduración incompleta. Este mismo resultado obtuvieron Medina-Puche et al. (2014) al silenciar *NCED1*. Además, comprobaron que la reducción de ABA en el fruto por la represión de *NCED1* provocaba una represión de *FaMYB10*. Estos resultados abren otra posibilidad en el papel de *FaNAC2* sobre el control de la maduración, ya que en lugar de activar a *FaMYB10* uniéndose a su promotor, podría activar la transcripción de *FaNCED1* que podría conllevar a la activación de *FaMYB10* y por ende, un aumento en la pigmentación (Figura 2.25). Estos resultados toman fuerza tras el reciente trabajo realizado en el fruto de mandarina, considerado no climatérico, donde CrNAC036 puede unirse a CrMYB68 para controlar la biosíntesis de ABA mediante la expresión de CrNCED5 (Zhu et al., 2020). Para aclarar estas hipótesis sería necesario hacer un ensayo de interacción física entre *FaNAC2* y el promotor de *FaNCED1* junto con los 2 experimentos propuestos anteriormente en este apartado (*FaMYB10* y promotor de *FaMYB10*).

Se ha relacionado en diferentes estudios, la acción del ABA con el incremento de azúcar en fruto, siendo los carbohidratos activadores de la ruta de acción de ABA, que daría lugar a la activación de genes codificantes de enzimas degradantes de la pared celular, y a la síntesis de antocianos (Jia et al., 2013, 2016; Palma et al., 2019). En el trabajo de Jia et al. (2013) demostraron que el azúcar estaba involucrado en la activación de la señalización por ABA, en concreto en el aumento de la transcripción *NCED* (biosíntesis de ABA). Además, comprobaron que la sacarosa es el polisacárido que induce de forma más directa este gen (más que la glucosa), por lo que estudiaron el efecto de la sacarosa sintetizada en fruto, y transportada desde las hojas. Comprobaron que los transportadores de sacarosa *FaSUT*, en especial *FaSUT1*, juegan un papel fundamental en el incremento de sacarosa en el fruto durante la maduración, y también, en el aumento de biosíntesis de ABA activando la expresión de *NCED*.

Nuestros resultados obtenidos con los frutos de las líneas *FaNAC2* 11 y *FaNAC3* 3, arrojan algo de luz en este asunto: dichos frutos no mostraron diferencias significativas en la cantidad de sólidos solubles, mostraron una represión de genes codificantes de enzimas *NCED* (en el caso de *FaNAC3* de forma leve), y no mostraron alteración en la transcripción del transportador de sacarosa *FaSUT1*. Esto nos sugiere que ambos factores de transcripción podrían estar involucrados en la activación de la transcripción de genes *NCED*, y por consiguiente en la biosíntesis de ABA, pero no en el transporte de sacarosa hacia el fruto. Una posibilidad de la ruta de señalización de ABA dependiente de sacarosa podría ser que la sacarosa se transporta desde las hojas hasta los frutos, incrementándose su concentración; esta sacarosa activaría a ambos factores de transcripción *NAC*, que posteriormente activarían la transcripción de genes *NCED*; por último, *NCED* aumentaría la biosíntesis de ABA, que actuaría sobre una batería de genes relacionados con la maduración. Otra opción plausible es que en esta cascada hipotética, la sacarosa active a *FaNAC2*, y este active a *FaNAC3*, que contribuiría a aumentar la transcripción de *NCED2*. Esta última posibilidad se ve reforzada con el hecho de que *FaNAC3* se mostró silenciado en los frutos con *FaNAC2* ARNi, sugiriendo un posible control de *FaNAC2* sobre *FaNAC3* en alguna ruta metabólica. Además, los análisis de expresión con ambos *NAC* realizados por Moyano et al. (2018) apoyan esta idea, ya que ambos *FaNAC* aumentaban su expresión en etapas avanzadas de la maduración del fruto, cuando el contenido de sacarosa es alto. Sin embargo, en la ruta biosintética de las antocianinas, el silenciamiento de *FaNAC2* mostró la represión de genes clave, mientras que el de *FaNAC3* no, sugiriendo que en algunos procesos *FaNAC2* controla a *FaNAC3*, pero en otros procesos actúan de forma independiente. Este proceso independiente podría desencadenarse con la activación de *NCED1* únicamente por *FaNAC2*, que conllevaría la transcripción de *FaMYB10*, y puede que después mediante una acción sinérgica de *FaNAC2*-*FaMYB10* se active la biosíntesis de antocianinas. Que un factor de transcripción tipo *NAC* actúe en numerosos procesos, con modos de actuación diferentes ya ha sido reportado anteriormente (Nuruzzaman et al., 2013). Un ejemplo de ello, es que un mismo factor de transcripción tipo *NAC* (*Os04g0477300*), se ha relacionado con la defensa frente a patógenos, senescencia y respuesta frente a deficiencias de boro y fósforo (Ochiai et al., 2011; Uauy et al., 2006; Waters et al., 2009). Esta hipótesis podría explicar que en ambas líneas cuyo transcriptoma ha sido analizado haya una alteración en el color pero no así en la acumulación de sólidos

solubles. Sin embargo, hasta el momento no se han aportado evidencias suficientes pero abre una nueva posibilidad para seguir indagando en la regulación de la maduración de la fresa relacionando la biosíntesis de ácido abscísico y la acumulación de azúcares mediante la acción de FTs NAC (Figura 2.25).

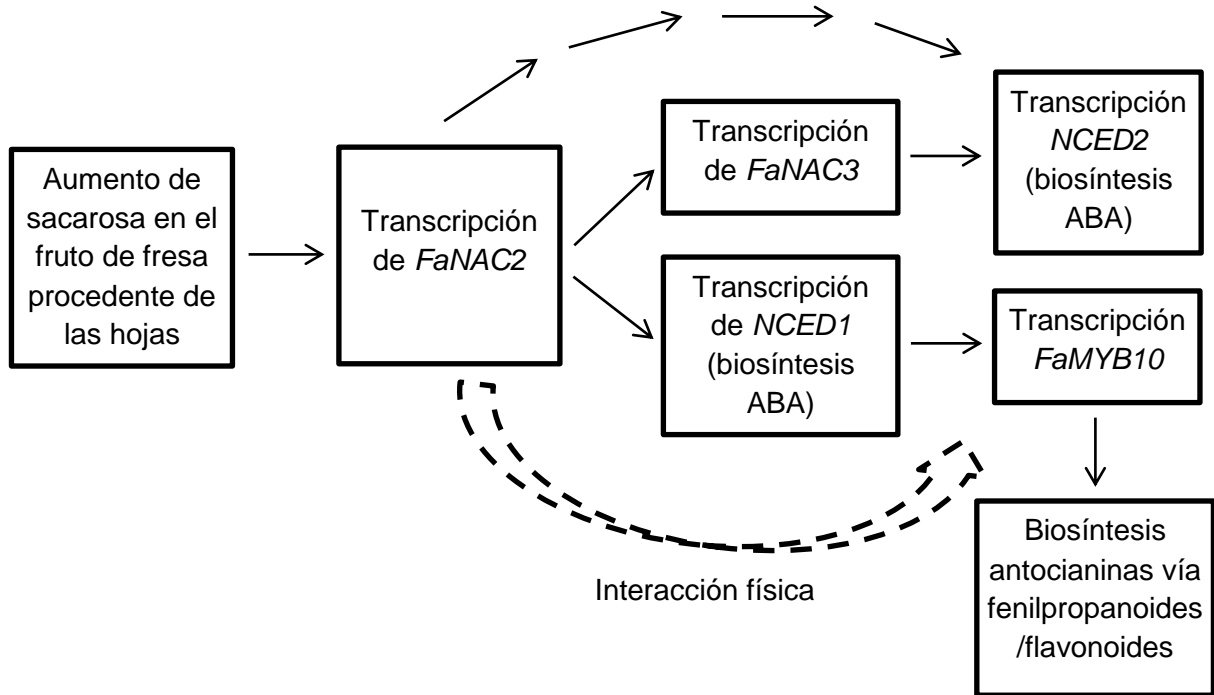


Figura 2.25: Diagrama de flujo que representa la hipótesis planteada acerca de la regulación de la producción de ABA y antocianinas durante la maduración de la fresa.

### II.4.3 Influencia de *FaNAC2* y *FaNAC3* en la composición de la pared celular

En el análisis de pared celular de frutos *FaNAC2* y *FaNAC3* se mostraron cambios en la composición con respecto a frutos control. Estos cambios en la pared celular probablemente provocaron un aumento en la firmeza de los frutos *FaNAC2*. Sin embargo, los frutos *FaNAC3* no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

El fruto de fresa, conforme avanza la maduración va cambiando la expresión de enzimas hidrolíticas de la pared celular, conllevando el desensamblaje de la misma, y disminuyendo su firmeza (Brummell, 2006; Posé et al., 2019). La regulación de estas enzimas, se ha comprobado que está influenciada por la acción de fitohormonas, siendo los FTs los que modulan los niveles de hormonales durante el desarrollo, afectando indirectamente en el desensamblaje de la pared celular (Moya-León et al., 2019). Han sido numerosos los estudios donde se ha comprobado que genes codificantes de enzimas relacionadas con la pared celular son controladas por hormonas: la auxina parece que inhibe la expresión de la PL,  $\beta$ -galacturonasa, expansinas, endoglucanasas, ramnagalacturonano liasa y xilosidasa (Trainotti et al.,

2001; Aharoni y O'Connell, 2002; Spolaore et al., 2003; Bustamante et al., 2006; Figueroa et al., 2009; Molina-Hidalgo et al., 2013), no afecta a la expresión de PG ni de varias expansinas (Medina-Escobar et al., 1997; Harpster et al., 1998; Nardi et al., 2014) e incrementa la expresión de PME y varias XTH (Figueroa et al., 2010; Nardi et al., 2014; Opazo et al., 2013). El ABA incrementa la expresión de una expansina, de una ramnogalacturonano liasa, de una xilosidasa y de varias XTH e inhibe la expresión de otra XTH (Civello et al., 1999; Castillejo et al., 2004; Bustamante et al., 2006; Molina-Hidalgo et al., 2013; Nardi et al., 2014). El ácido giberélico incrementa la expresión de varias XTH y reduce la expresión de una xilosidasa (Medina-Escobar et al., 1997; Opazo et al., 2013). El etileno aumenta la expresión de una PG, y reprime otra, además reduce la expresión de diferentes enzimas degradantes de XG y una PL (Villarreal et al., 2010; Merchante et al., 2013; Villarreal et al., 2016). En cuanto a su acción en las enzimas PME y  $\beta$ -galacturonasa, hay en algunas que se ven activadas y en otras reprimidas (Castillejo et al., 2004). El JA, incrementa la expresión de XTH, y la de una endoglucanasa (Concha et al., 2013).

En resumen, las fitohormonas ejercen un control sobre las enzimas encargadas de modificar la pared celular, habiendo hormonas que pueden ejercer papeles antagónicos en una misma familia de enzimas. En nuestro caso, el silenciamiento de ambos FTs NAC, alteraron prácticamente todas las rutas hormonales, y eso se tradujo en numerosos cambios en la expresión de enzimas degradantes de pared celular.

La línea *FaNAC2* 11 mostró una reducción en la expresión de 2 genes que codifican a enzimas endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, 3 genes que codifican a enzimas  $\beta$ -galactosidasas y 1 que expresa una PME, mientras que hubo un incremento en la expresión de 1 gen codificante de una celulosa sintasa, otro que expresa otra endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, 11 codificantes de enzimas XTH, 1 codificante de una  $\beta$ -D xilosidasa, otro que expresa una arabinofuranosidasa, 3 genes codificantes de PME, 1 de PL, 1 de expansina, 4 codificantes de *plasmodesmata callose-binding protein* (PDCB) y 2 que expresan AGP de tipo FASCICLIN. En cuanto a la cantidad de pectinas lo más destacable en esta línea fue un aumento en la cantidad de HG en la fracción soluble y en la fracción retenida por enlaces iónicos a la pared celular primaria (agua y CDTA) especialmente en los HG con un bajo grado de desmetilación. Sin embargo, en las fracciones fuertemente retenidas a la pared primaria (carbonato y KOH) la línea *FaNAC2* 11 mostró valores similares o algo inferiores de HG con respecto a los frutos control. La cantidad de HG de baja metilación volvió a ser mayor en la línea *FaNAC2* 11 tras tratar con celulasa, indicando una posible retención de HG en la pared primaria. En cuanto a la cantidad de esqueleto de RG-1 la los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron valores similares en las fracciones solubles y débilmente retenidas con respecto a los frutos control, mientras que en las fracciones enriquecidas de pectinas fuertemente unidas mostraron una reducción. Este hecho podría haberse favorecido por la alta expresión que mostraron 2 PME ( $\log_2$  fold change de 5,1 y 3,4), causante de la alta cantidad de HG con bajo grado de esterificación mostrado por esta línea. La desmetilación de HG es fundamental para la acción de otras enzimas despolimerizantes como PG o PL, pues estas enzimas actúan en HG con bajas metilaciones (Draye y Van Cutsem, 2008). La alta desmetilación podría facilitar la acción de pectinasas, que acompañado de la sobreexpresión de una PL provocaría una reducción en la cantidad de pectinas. Otra opción, aunque puede que relacionada,

es la baja cantidad mostrada por los frutos de la línea *FaNAC2* 11 en la cantidad de ramificaciones de arabinanos, pudiendo facilitar la acción de enzimas RG liasa (Oomen et al., 2002). Esta reducción en la cantidad de arabinanos podría haber sido favorecida por la sobreexpresión de una arabinofuranosidasa. Sin embargo, la represión de 3 genes codificantes de  $\beta$ -galactosidasas pudo provocar que la tendencia mostrada por las ramificaciones de galactanos fuera contraria, mostrándose mayor señal en los frutos de la línea *FaNAC2* 11 que en los frutos control en todas las fracciones, a excepción de la carbonato.

Una mayor cantidad componente celulósico-hemicelulósico podría estar reteniendo y enmascarando la cantidad real de pectinas en las fracciones carbonato y KOH, pudiendo ser mayores los valores de RG-1 que los mostrados. Esa hipótesis surge del hecho, de que en la fracción carbonato y KOH 4 M, la línea *FaNAC2* 11 muestra valores más bajos de RG-1 que la línea control, sin embargo, al tratar con celulasa, la cantidad de RG-1 es superior. Esta hipótesis se refuerza con que los frutos de la línea *FaNAC2* 11 mostraron una sobreexpresión de un gen relacionado con la síntesis de celulosa (celulosa sintasa) y una represión de 2 genes codificantes de enzimas despolimerizantes de la celulosa de tipo endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, siendo en uno muy acusada la reducción ( $\log_2$  fold change -5,9). Al separar las fracciones KOH 4 M por cromatografía, la señal de RG-1 en la línea *FaNAC2* 11 muestra un valor similar (e incluso algo superior) a la línea control, mientras que antes de ser pasada por la columna de intercambio aniónico, la línea control tiene claramente una señal más alta. Esto es aplicable para las señales mostradas por las ramificaciones de RG-1, sugiriendo que las señales pueden estar enmascaradas en las fracciones carbonato y KOH por otros componentes, como pudiera ser la celulosa, como consecuencia de un aumento en su síntesis y una reducción de su despolimerización. Además, esto se refuerza con el hecho de que a pesar de sobreexpresarse 11 genes codificantes de enzimas despolimerizantes de XG de tipos XTH en la línea *FaNAC2* 11, no se tradujo en una reducción de señal.

El silenciamiento de *FaNAC3* también provocó la reducción y el aumento de expresión en numerosas enzimas relacionadas con la pared celular. Las alteraciones más claras fueron, represión de 3 genes codificantes de expansinas y sobreexpresión de 3 genes codificantes de celulosa sintasa, de 1 que expresa una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, de 4 genes codificantes de poligalacturonasas y de 1 que expresa una PDCB. Además, hubo numerosas familias de genes que mostraron represiones y sobreexpresiones, genes codificantes de  $\beta$ -galactosidasas mostraron 1 gen reprimido y otro sobreexpresado; genes codificantes de PME siendo 3 los que vieron reducida su expresión y 2 que la vieron aumentada; también genes codificantes de XTH mostraron 1 represión y 2 sobreexpresiones; 1 gen codificante de AGP de tipo FASCICLIN fue reprimido, y otro sobreexpresado. Sin embargo, las diferencias mostradas en el análisis por ELISA fueron menos importantes que las citadas en los frutos de las líneas *FaNAC2*. La diferencia más importante fue un incremento de ramificaciones de RG-1 en forma de galactanos (detectado por el anticuerpo LM26) en la fracción KOH 4 M, siendo confirmado este incremento tras la separación por cromatografía de intercambio aniónico. La línea *FaNAC3* 3 no mostró grandes diferencias de señal al tratar con celulasa la fracción KOH 4 M, por lo que probablemente no tuviera tanta cantidad de este componente como la citada para las líneas *FaNAC2*.

El silenciamiento de ambos genes *FaNAC* provocó alteraciones en la cantidad de pectinas, siendo más acusadas en al silenciar *FaNAC2*. Anteriormente, Carrasco-Orellana et al. (2018) ya propusieron en fruto de *F. chiloensis* el FT FcNAC1 como posible promotor del desensamblaje de la pared celular mediante la activación de la transcripción de la PL. Nuestros resultados también apuntan a que los dos FTs *FaNAC* estudiados están involucrados en el desensamblaje de la pared celular, incluyendo las pectinas, siendo más importante el papel ejercido por *FaNAC2*.

Sin embargo, los cambios más importantes mostrados en el análisis de pared celular, a parte de los comentados en la cantidad de celulosa en los frutos de las líneas *FaNAC2*, fueron en los componentes de calosa y de AGP. La calosa es un polímero de glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,3, que puede tener ramificaciones mediante enlaces  $\beta$ -1,6 (Chen y Kim, 2009). Este polímero se ha relacionado como una defensa frente a patógenos, facilitándose su deposición en la pared celular tras el reconocimiento de moléculas PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) (Amil-Ruiz et al., 2011). Su deposición se ha relacionado con la fortificación de la pared celular para dificultar el contacto y la invasión del patógeno a la célula (Aist, 1976; Kwon et al., 2008; Luna et al., 2011). Esta molécula ha sido asociada a respuestas frente a patógenos, mediante vías dependientes e independientes de SA (Geng et al., 2012; Yi et al., 2014). El silenciamiento de *FaNAC2* provocó un aumento en la cantidad de calosa en la fracción KOH 4 M, siendo corroborado tras la separación por columna de intercambio aniónico, indicando un aumento de componentes neutros (calosa). Estos resultados son apoyados por el análisis transcriptómico de la línea *FaNAC2* 11, donde hay una sobreexpresión de 4 genes codificantes de probables proteínas PDCB, siendo estas proteínas importantes en la deposición de calosa en la pared celular (Simpson et al., 2009). En el caso de *FaNAC3*, su silenciamiento no provocó cambios en la señal emitida por calosa, aunque sí provocó un aumento en la transcripción de 1 probable PDCB. La sobreexpresión de menos proteínas PDCB podría ser la causa de que no aumentara el nivel de calosa en las líneas *FaNAC3* ARNi.

Una posible causa de este aumento en la deposición de calosa por parte de la línea *FaNAC2* 11 puede ser por una sobreexpresión de dos genes codificantes de la enzimas linolato 9S lipoxigenasa (9LOX), siendo en uno de ellos notable esta sobreexpresión ( $\log_2$  fold change 3,8). Esta enzima actúa en la ruta metabólica de los ácidos  $\alpha$ -linolénicos, relacionada con la biosíntesis de ácido jasmónico. Marcos et al. (2015) comprobaron en *Arabidopsis* que los productos resultantes de la enzima 9LOX, llamados oxilipinas, actúan como moléculas señalizadoras que activan la ruta de los brasinoesteroides mediante moléculas ROS tras el ataque de un patógeno. Esta ruta de señalización conlleva una fortificación de la pared celular con un aumento de lignina y de calosa. Esto es reforzado con los resultados obtenidos con los frutos de la línea *FaNAC3* 3, donde a parte de no haber aumento en la cantidad de calosa, no solo no hubo sobreexpresión de genes codificantes de enzimas 9LOX, si no que además se reprimieron levemente 3 genes.

Como se ha comentado, la acción de 9LOX y la deposición de calosa parecen estar conectadas a través de la vía de actuación de los brasinoesteroides. Los frutos de ambos *FaNAC* mostraron un sobreexpresión generaliza en la ruta biosintética de los brasinoesteroides. Sin embargo, los frutos de la línea *FaNAC2* 11 fueron los únicos que mostraron alteraciones en la expresión génica de proteínas que intervienen en la

vía de señalización de esta hormona, apuntando en la misma dirección. En el análisis transcriptómico hay una sobreexpresión generalizada de la vía de señalización de los brasinoesteroides. Aunque la mayoría de las sobreexpresiones fueron leves, hubo un aumento en la expresión de moduladores positivos BSK (FvH4\_5g21570.1) y BZR1/2 (FvH4\_2g40170.1), ambos con un  $\log_2$  fold change de 0,7 (Wang et al., 2002; Tang et al., 2008; Yu et al., 2018). También se sobreexpresó el represor BK11 ( $\log_2$  fold change 1,7), que a pesar de ser considerado un modulador negativo, se ha comprobado que una vez fosforilado y desligado de la membrana se transloca al núcleo donde puede promover la vía de señalización acumulando moduladores positivos como BES1 y BZR1, favoreciendo la acción sobre los genes susceptibles de ser regulados (Wang et al., 2011). De hecho, se registraron dos aumentos leves de expresión en genes que responden a los brasinoesteroides, codificantes de proteínas CYCD3 (FvH4\_2g05460.1 y FvH4\_1g16680.1) ( $\log_2$  fold change 1,4 y 1,3) (Hu et al., 2000). A pesar de que estas sobreexpresiones no son acusadas, dichas alteraciones no se registraron en los frutos de la línea *FaNAC3* 3, donde no hubo alteraciones en la vía de señalización de brasinoesteroides.

El papel represor de *FaNAC2* en la transcripción de enzimas 9LOX podría ser la clave de una respuesta frente a patógenos mediada por brasinoesteroides, que incluye una fortificación de la pared celular con un aumento en la deposición de calosa. Esto, junto con la no participación de *FaNAC3* en la síntesis de oxilipinas, y por ende, en la respuesta provocada por brasinoesteroides, puede marcar la diferencia en las firmezas mostradas por las líneas *FaNAC2* y *FaNAC3*, causado por diferencias en la deposición de calosa. El papel de los brasinoesteroides en la respuesta frente a patógenos en el fruto de fresa es bastante desconocido, abriendo estos resultados una vía de exploración donde un FT NAC podría regular una respuesta frente a patógenos mediante la activación de la síntesis de oxilipinas junto con el aumento de la acción de los brasinoesteroides, resultando un fruto más firme debido a un fortalecimiento de la pared celular por acumulación de calosa. Tan sólo hay un trabajo publicado realizado en fresa, con hojas *in vitro*, donde la aplicación de brasinoesteroides aumentó la deposición de calosa y de lignina, provocando un aumento de ROS y de NO, probablemente como moléculas señalizadoras activadoras del sistema inmune de la planta. Estos mecanismos confirieron a las hojas una mayor resistencia frente al hongo *Colletotricum acutatum* (Furio et al., 2019). Estas alteraciones, tanto en la pared celular, como en las moléculas señalizadoras, son parecidas a las detectadas en este trabajo, lo que sugiere que uno de los papeles claves de *FaNAC2* es reprimir la respuesta de los brasinoesteroides mediante la represión de la transcripción de enzimas 9LOX.

Las AGP son glicoproteínas de plantas que están formadas por una proteína central a la que se le unen uno o más carbohidratos, formados por galactanos y arabinanos. Otra característica, es que a menudo estos arabinogalactanos tienen un enganche lipídico de glicosilfosfatidilinositol, que parece ser importante en su función (Seifert y Roberts, 2007). Estas AGP, debido a su capacidad de anclarse a la membrana plasmática, a la pared celular, y a su naturaleza proteica, se les han relacionado con numerosos procesos en la planta, como la división celular, (Serpe y Nothnagel, 1994; Langan y Nothnagel, 1997), crecimiento de tubo polínico, mantenimiento de integridad de las pectinas (Seifert y Roberts, 2007; Nguema-Ona et al., 2012), integración con

diferentes rutas de acción hormonal, aunque con funciones no esclarecidas debido a su interacción con hormonas antagónicas (Park et al., 2003; Sun et al., 2004) o evitando la muerte celular programada, reprimiendo una respuesta por daños mecánicos (Guan y Nothnagel, 2004). También, han sido asociadas con la respuesta frente a microorganismos, aunque con un papel dudoso, pudiendo afectar a la síntesis de celulosa, a la deposición de calosa y a la acción de la pectato liasa, ejerciendo un papel importante en la comunicación entre el metabolismo de la pared celular y las señales intracelulares (Schulze-Lefert, 2004; Somerville et al., 2004; Seifert y Roberts, 2007; Jamet et al., 2008; Leszczuk et al., 2019).

Al silenciar *FaNAC2*, hubo una reducción en la señal emitida por el anticuerpo JIM 13, específico de AGP, en la fracción agua, CDTA y carbonato. Sin embargo, hubo un incremento en las fracciones extraídas de la pared primaria (KOH 4 M y celulosa), indicando una vez más, que los cambios en la celulosa podrían ser uno de los cambios principales mostrados por las líneas *FaNAC2*. La línea *FaNAC2* 11 mostró una sobreexpresión de dos genes codificantes de proteínas tipo FASCICLIN ( $\log_2$  fold change 2,2 y 1,6). Estas proteínas son una subclase de AGP (Gaspar et al., 2001; Haihai Wang et al., 2015), y normalmente tienen un conector glicosilfosfatidilinositol, que podría conectar con la membrana plasmática, haciéndolas candidatas de percibir y transmitir señales, desde el interior de la célula hasta la pared celular, y viceversa. Además, parece que esta subfamilia está implicada en la biosíntesis, señalización y remodelaje de la pared celular (Ellis et al., 2010). El silenciamiento de *FaNAC3*, provocó en la línea 3 un aumento de la señal de AGP en la fracción carbonato, no así en el resto de fracciones, mostrando un valor similar que la línea control. La línea 10, sí mostró un aumento generalizado de la señal de AGP en todas las fracciones. El análisis transcriptómico de la línea 3 reveló un aumento y una reducción en la expresión de un gen codificante de una AGP de tipo FASCICLIN ( $\log_2$  fold change 1,8 y -2,6).

La sobreexpresión de 2 posibles FASCICLIN con el silenciamiento de *FaNAC2*, o la represión de 1 AGP FASCICLIN en la línea *FaNAC3* 3, podría ser clave en las diferencias mostradas en la pared celular de ambas líneas transgénicas, ya que las AGP pueden provocar un aumento en la síntesis de celulosa y en la deposición de calosa, perfil mostrado únicamente por los frutos de las líneas *FaNAC2*. Este aumento de celulosa, junto con el aumento de calosa, podrían ser las causas del aumento de firmeza en fruto (Eskin, 2012; Liu et al., 2019), explicando que el silenciamiento de *FaNAC2* originara frutos significativamente más firmes que los frutos control, y que este aumento de firmeza no se observara con el silenciamiento de *FaNAC3*.

En fruto de tomate se relacionó un FT NAC con el retraso de la maduración y con la resistencia frente al patógeno *Botrytis cinérea* mediante la regulación de enzimas relacionadas con el desensamblaje de la pared celular durante la maduración, *LeEXP1* (expansina) y *LePG* (poligalacturonasa) (Cantu et al., 2009). Nuestros resultados sugieren que a pesar de los cambios registrados en la composición de pectinas en frutos de las líneas de ambos *FaNAC*, la diferencia de firmeza mostrada en los frutos *FaNAC2* podría estar más relacionada con un posible papel de este FT en una respuesta frente a patógenos que implica una pared primaria más reforzada, y no tanto en una menor despolimerización de pectinas, ya que los cambios más importantes

registrados fueron de componentes que están más ligados a la pared celular primaria que a la láminilla media, como son la celulosa, calosa y AGP.



# Capítulo III: Caracterización del gen *FaRGlyase 1* en frutos de *F. x ananassa* Duch. ‘Chandler’



## Capítulo III: Caracterización del gen *FaRGlyase 1* en frutos de *F. x ananassa* Duch. 'Chandler'

### III.1 Introducción

La fresa es una infrutescencia, considerada un fruto blando, de una gran importancia económica en todo el mundo, ya que tanto sus propiedades organolépticas (Vallarino et al., 2018) como sus propiedades nutricionales beneficiosas para la salud (Giampieri et al., 2015; Giampieri et al., 2017; Basu et al., 2018) han hecho que su demanda vaya en aumento (Samtani et al., 2019).

La maduración de la fresa es una combinación de procesos fisiológicos y bioquímicos que confieren al fruto propiedades que lo hacen más atractivo para su consumo (Gapper et al., 2013). Uno de los principales problemas para la comercialización de las fresas es que su vida poscosecha es muy corta, reblandeciéndose rápidamente, produciendo grandes pérdidas económicas durante el transporte y almacenaje de los frutos (Sharma et al., 2019).

La corta vida poscosecha se debe en gran parte al desensamblaje de la pared celular provocada principalmente por la disolución de la lámina media, lo que conlleva una reducción de las zonas de adhesión entre células (Brummell, 2006; Goulao y Oliveira, 2008).

La pared celular primaria está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa (xiloglucanos (XG) fundamentalmente), pectinas, y en menor proporción proteínas (Carpita y Gibeaut, 1993). La despolimerización de la celulosa parece que no juega un papel importante en el reblandecimiento del fruto durante la maduración (Koh y Melton, 2002). Tampoco parece que la reducción de hemicelulosa durante la maduración sea el proceso determinante en el reblandecimiento del fruto (Mercado et al., 2010; Nardi et al., 2014). Sin embargo, todo apunta a que las pectinas son el dominio que más influye en la reducción de firmeza del fruto (Rosli et al., 2004; Moya-León et al., 2019).

Durante la maduración de la fresa ocurre una solubilización de pectinas que se traduce en un incremento de las pectinas solubilizadas y unidas por enlaces iónicos, extraíbles con agua y con agentes quelantes como CDTA respectivamente (Huber, 1984; Koh y Melton, 2002), y una disminución de pectinas unidas covalentemente, extraíbles con carbonato sódico (Posé et al., 2011). La solubilización y despolimerización de las pectinas va acompañada de la pérdida de azúcares neutros procedentes de las cadenas laterales de ramnogalacturonano I (RG-1) (Figuerola et al., 2008).

Todos estos cambios se deben en gran medida a la acción secuencial y coordinada de una gran variedad de enzimas que son secretadas en el apoplasto durante el desarrollo y la maduración (Opazo et al., 2010), siendo la mayoría enzimas relacionadas con el reblandecimiento de la fresa y producidas en mayor cantidad conforme avanza la maduración (Brummell y Harpster, 2001).

Una estrategia que se ha seguido para conocer mejor el proceso de desensamblaje de la pared celular durante la maduración ha sido la de bloquear la expresión de genes que seguían un patrón de expresión creciente con la maduración, y comprobar después su efecto en la estructura de la pared celular y, por ende, en la firmeza del fruto. De esta forma se ha comprobado la implicación de diferentes pectinasas en la firmeza del fruto: poligalacturonasa (PG) (García-Gago et al., 2009; Quesada et al., 2009; Posé et al., 2013; Paniagua et al., 2020), pectin metil esterasa (PME) (Osorio et al., 2008), pectato liasa (PL) (Santiago-Doménech et al., 2008) o la  $\beta$ -galactosidasa (Paniagua et al., 2016), comprobándose en todos los trabajos que el silenciamiento de los genes que codifican estas enzimas aumentaba la firmeza del fruto y la vida poscosecha, evidenciando la importancia de las pectinas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

Se ha comprobado que el RG-1 puede jugar un papel clave en la integridad de la pared celular durante la maduración del fruto, ya que a través de sus ramificaciones en forma de arabinanos y galactanos puede establecer conexiones con las microfibrillas de celulosa (Zykwinska et al., 2005). El RG-1 está formado por una columna vertebral de unidades alternantes de ramnosa y ácido galacturónico, unidos por enlaces  $\alpha$  1,2 y  $\alpha$  1,4, es decir, de disacáridos [ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -l-Ramp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-AGalp-(1 $\rightarrow$ )] (McNeil et al., 1980; Lau et al., 1985; Voragen et al., 2008). Los residuos AGalp pueden estar acetilados en las posiciones O-2 y/o O-3, siendo el grado de acetilación diferente dependiendo del tejido. Además los residuos de Ramp puede contener ramificaciones en la posición O-4 y/o O-3 (Silva et al., 2016).

Las cadenas laterales suelen estar compuestas por azúcares neutros, formados principalmente por  $\beta$ -D-galactopiranosilo y / o  $\alpha$ -D-arabinofuranosilo. La complejidad del RG-1 reside en que estas cadenas laterales tienen tamaños variables que van desde una sola unidad hasta polímeros con 50 unidades o más: arabinanos, galactoarabinanos, galactanos, arabinogalactanos de tipo I (AGI) y arabinogalactanos de tipo II (AGII) (Lerouge et al., 1993). Los AGI están compuestos por cadenas de (1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-galactanos conectados a unidades de arabinosa en las posiciones O-3 de muchas unidades de galactosa (Bacic et al., 1988). Los AGII son un amplio grupo de cortas cadenas (1 $\rightarrow$ 3) y (1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-galactanos conectadas con otras cadenas por enlaces (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6) en los puntos de ramificación, además de que la mayoría de unidades de galactosa tienen los grupos O-3 y O-6 ocupados por grupos de arabinosa (Fincher et al., 1983). Además, estos AGII suelen estar asociados a proteínas llamadas proteínas de arabinogalactanos. Los arabinanos por su parte pueden conectarse entre sí en prácticamente todas las posiciones libres, O-2, O-3 y O-5, formando un grupo muy diverso de ramificaciones (Carpita y Gibeaut, 1993). Esta complejidad en las ramificaciones es responsable de la complejidad química y estructural de las pectinas, pudiendo el RG-1 representar hasta el 35 % de la masa total de las pectinas (Mohnen, 2008).

Hay diferentes enzimas que degradan el RG-1 y pueden clasificarse según su acción: en primer lugar si catalizan la escisión por hidrólisis (hidrolasas) o por la eliminación del enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (liasas) entre disacáridos, y en segundo lugar, dependiendo de su patrón de acción pueden ser "endo" cuando corta aleatoriamente en puntos no terminales, y "exo" cuando corta en extremo terminal (Sakai et al., 1993). Se han caracterizado al menos 23 enzimas que atacan el esqueleto de RG-1 en hongos, 11

son hidrolasas y 12 son liasas (Lombard et al., 2014), sin embargo, el papel de estas enzimas en la pérdida de firmeza del fruto durante la maduración aún es poco conocido.

En plantas se han realizado varios trabajos alterando la expresión de genes que codifican enzimas ramnogalacturonano liasa, obteniendo fenotipos interesantes que sugieren un papel importante de estas enzimas en la estructura de la pared celular. Oomen et al. (2002), mediante la sobreexpresión de una ramnogalacturonano liasa procedente del hongo *Aspergillus aculeatus* en tubérculo de patata, observaron alteraciones en la localización y cantidad de arabinanos y galactanos, junto con cambios en la morfología de la patata. En fresa (*Fragaria x ananassa*), Molina-Hidalgo et al. (2013) caracterizaron un gen que codifica una ramnogalacturonano liasa cuya expresión aumenta durante la maduración del fruto y que, además, es específica de receptáculo. También comprobaron que la auxina reprime su expresión, mientras que el ABA la induce. En cuanto a su papel en el mantenimiento de la estructura de la pared celular, el silenciamiento de *FaRGlyase 1* por transformación transitoria provocó una lámina media más organizada junto con una mayor área de contacto intercelular, sugiriendo que esta enzima juega un papel clave en el desensamblaje de la pared celular durante la maduración de la fresa. Resultados similares se han conseguido en tomate donde, reprimiendo un gen con alta similitud a *FaRGlyase 1*, se obtuvieron frutos con mayor firmeza y vida útil. Estudios adicionales de actividad enzimática de ramnogalacturonano endoliasa, mostraron que dicha actividad enzimática era muy baja (Ochoa-Jiménez et al., 2018). En *Fragaria chiloensis*, también se ha aislado y caracterizado una ramnogalacturonano endoliasa cuya expresión aumenta en estadios avanzados de maduración del receptáculo, en paralelo a una pérdida de firmeza, sugiriendo un papel importante en el desensamblaje de la pared celular del fruto (Méndez-Yañez et al., 2020).

Estos datos ponen de manifiesto que la despolimerización de RG-1, por la acción de ramnogalacturonano liasas, puede ser un proceso clave en el reblandecimiento del fruto durante la maduración y, por tanto, una posible diana biotecnológica para evitar pérdidas por sobremaduración.

En este trabajo se ha realizado la caracterización de frutos procedentes de líneas transgénicas estables con el gen *FaRGlyase 1* silenciado, así como un análisis de la composición y estructura de la pared celular para aportar más datos acerca del papel que juega el RG-1 en la estructura de la pared celular durante la maduración y, por ende, en el reblandecimiento del fruto.



## III.2 Material y Métodos

### III.2.1 Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo fueron de *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* usando ARNi para silenciar el gen *FaRGlyase 1* codificante de una ramnogalacturonano endoliasa específica de fruto. La transformación y regeneración de dichas plantas se llevaron a cabo por miembros del grupo Mejora y Biotecnología de Especies Hortofrutícolas (AGR-226) del área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la sección II.2.1 del Capítulo II. La construcción génica utilizada fue realizada por el grupo liderado por el Dr. Juan Muñoz en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Así mismo, miembros de este grupo realizaron un estudio de niveles de expresión mediante qPCR del gen *FaRGlyase 1* en frutos producidos por dichas plantas que permitió seleccionar dos líneas independientes, FaRG 26 y FaRG 87, con un 94 % y 92 % de silenciamiento de dicho gen, respectivamente. Estas líneas fueron las que se escogieron para una mayor caracterización en este trabajo.

### III.2.2 Fenotipado

Para el análisis del fenotipo de los frutos producidos por estas líneas con el gen *FaRGlyase 1* silenciado se recogieron frutos en estadio maduro durante los meses comprendidos entre marzo y junio de 2016, tanto de las líneas FaRG 26 y FaRG 87 como de plantas *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' no transgénicas que se utilizaron como testigo. Se analizaron 29 frutos de la línea FaRG 26 y 38 de la línea FaRG 87, comparándose con los frutos testigos cosechados los mismos días con el fin de evitar registrar diferencias producidas por factores externos, usándose al menos 80 frutos no transgénicos en cada comparación. De cada fruto cosechado se registró el peso, la longitud, la anchura, el color, la firmeza y los sólidos solubles siguiendo la metodología y usando los materiales descritos en el epígrafe II.2.2 de Material y Métodos del Capítulo II de este trabajo. También se marcaron al menos 10 flores en anthesis de las líneas FaRG 26 y FaRG 87 para hacer un seguimiento en el tiempo del desarrollo y de la maduración de los frutos comparándolos con flores control no transformadas marcadas en el mismo estadio y en el mismo día.

### III.2.3 Análisis transcriptómico

#### III.2.3.1 Preparación del material

La preparación de los frutos usados para el análisis de expresión génica se realizó tal como se describe en el apartado II.2.3.1 de Materiales y Métodos del Capítulo II. De forma resumida, para cada línea se hicieron 3 grupos de 4 frutos en estadio rojo, tomándose cada grupo como una réplica biológica. A los diferentes grupos de frutos se les eliminaron los aquenios y fueron homogenizados usando mortero y nitrógeno líquido.

### III.2.3.2 Extracción ARN

Las extracciones de ARN se hicieron a partir de los grupos de frutos preparados de las líneas FaRG y control. El procedimiento que se siguió fue el descrito por Gambino et al. (2008) con algunas modificaciones como se describen en el apartado II.2.3.2 de Materiales y Métodos del Capítulo II.

### III.2.3.3 Tratamiento con DNAsa

El ARN fue tratado con DNAsa para eliminar los posibles restos de ADN, tal como se describió en el apartado II.2.3.3 de Materiales y Métodos del Capítulo II, usando una unidad de la DNAsa I recombinante de la casa comercial Roche por cada  $\mu\text{g}$  de ARN.

### III.2.3.4 Purificación de ARN

Tras el tratamiento con DNAsa, las muestras se purificaron con fenol:cloroformo (1:1 v:v) siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.2.3.4 de Materiales y Métodos del Capítulo II, usando acetato sódico para precipitar el ARN y etanol para eliminar el exceso de sales. Tras la purificación se hizo una PCR para comprobar la ausencia de restos de ADN.

### III.2.3.5 Análisis transcriptómico

El análisis transcriptómico se realizó de forma similar a la descrita en el apartado II.2.3.7 del Capítulo II. De forma resumida, la calidad del ARN extraído de los frutos maduros de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control se caracterizó en un Bioanalyzer asegurando que la integridad del ARN de las muestras presentaba un  $R_{in} > 8$ . La empresa Novogene (Novogene Corporation, Beijing, China) realizó la secuenciación de ARN usando la tecnología Illumina HiSeq 2500/3000, asegurando al menos 40 millones de lecturas por muestra.

Se generaron parámetros que sirven de indicadores de calidad del ensayo como son la tasa de error de las bases, Q20, Q30, el porcentaje de GC o el porcentaje de lecturas mapeadas con éxito. Las lecturas obtenidas se filtraron eliminando lecturas con adaptadores, lecturas con más de un 10 % de indeterminaciones y lecturas de baja calidad. Con las lecturas filtradas se hizo un cartografiado de los fragmentos en el genoma de *Fragaria vesca* v4.0.a1 (Edger et al., 2017) usando el programa Tophat2.

El nivel de expresión del gen se estimó por la abundancia del transcrito aplicando el método FPKM (Fragmentos Por Kilobase de secuencia por Millón). La expresión génica en las muestras de las líneas FaRG 26 y FaRG 87 con respecto a las muestras de la línea control se comparó utilizando el paquete de R DESeq (1.18.0). Los valores P resultantes se ajustaron utilizando el enfoque de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de falso descubrimiento (FDR). Los genes con un valor de P ajustado  $< 0,05$  tras DESeq fueron anotados como diferencialmente expresados (Anders y

Huber, 2010). Para comprobar la confiabilidad del ensayo se compararon los datos de expresión de las diferentes réplicas mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

### III.2.4 Estudio de pared celular

#### III.2.4.1 Extracción de pared celular

Se hizo la extracción de pared celular de 4 réplicas biológicas de 4 frutos por cada línea analizada (FaRG 26, FaRG 87 y control). La extracción se hizo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el epígrafe II.2.7.1 de Material y Métodos del Capítulo II. De forma resumida, se utilizaron 20 ml de PAW (fenol, ácido acético y agua en proporción 2:1:1; p:v:v) para 10 g de tejido. Tras hacer un par de lavados con agua, se hizo un tratamiento con DMSO para eliminar gránulos de almidón. Por último, se liofilizaron las muestras para extraer toda la humedad.

#### III.2.4.2 Fraccionamiento de la pared celular

A partir de los extractos de pared celular se realizó un fraccionamiento siguiendo el protocolo descrito en Santiago-Doménech et al. (2008) con algunas modificaciones.

Se usaron 150 mg de pared celular liofilizada que fue molida con mortero y pistilo en nitrógeno líquido. Al material así pulverizado y pesado se añadieron 37,5 mL de agua destilada y se incubó la mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación rotatoria. Tras la incubación se centrifugó a 10000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se guardó y el pellet fue lavado 2 veces con 18 mL de agua destilada, repitiendo la centrifugación y combinando los 3 sobrenadantes obtenidos. Esta mezcla de sobrenadantes se pasó por un filtro de vidrio de 1,20 µm (FV-C, Albet). Este sobrenadante filtrado se denominó fracción "agua".

El residuo insoluble obtenido tras el paso anterior fue tratado con CDTA (Trans 1-2 diaminociclohexano NNN'N' ácido monohidrato tetraacético 50 mM diluido en acetato potásico 50 mM a pH 6) siguiendo el mismo procedimiento que con el agua, y dando lugar a la fracción denominada "CDTA". Esto se repitió con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM y NaBH<sub>4</sub> 0,1 %), KOH 1 M (y NaBH<sub>4</sub> 0,1 %) y KOH 4 M (y NaBH<sub>4</sub> 0,1 %), pero en estos 3 casos las fracciones fueron neutralizadas con ácido acético glacial hasta que alcanzaron un pH de 5.

Todas las fracciones fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso para evitar que se degradaran.

Antes de concentrar el volumen obtenido, las fracciones fueron dializadas frente a agua destilada con membranas *Snakeskin Pleated Dialysis Tubing* (Thermo Fisher Scientific; Código de catálogo 68100) con 10 kDa de tamaño de exclusión de partículas. Las fracciones se introdujeron en las membranas y dichas membranas se introdujeron en un cubo de 5 L de capacidad lleno de agua destilada. La diálisis se realizó a 4 °C y con agitación constante del agua, renovando el agua cada 8 horas, hasta un tiempo de entre 5 y 15 días según la muestra. En todos los casos, el proceso

de diálisis se dio por finalizando cuando la conductividad del agua se mantenía estable en torno a 1,4  $\mu\text{S}$  (medido con un conductímetro 524 Crison).

Una vez finalizada la diálisis las fracciones fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El siguiente paso fue concentrar las muestras usando un rotavapor (Büchi R-205), hasta que el volumen de las muestras no superaba los 10 mL.

Tras ser concentrados en el rotavapor, las fracciones fueron liofilizadas durante 24 horas. Finalmente, el residuo seco obtenido de cada fracción fue pesado con el fin de poder comparar el rendimiento entre las diferentes líneas. Se hicieron 3 réplicas de fraccionamiento de pared celular de cada línea estudiada.

#### III.2.4.3 Cuantificación de azúcares ácidos

El contenido en azúcares ácidos de cada fracción de pared celular de fruto maduro se cuantificó mediante el método con carbazol. Se usó ácido sulfámico 4 M, bórax 75 mM diluido en ácido sulfúrico y carbazol al 0,1% en etanol. Como recta patrón se usó ácido galacturónico a 0, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras se usaron a una concentración de 82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fracción disuelta en acetato sódico 0,2 M, para las fracciones PAW, agua y CDTA, y en tampón TRIS 0,05 M para el resto de fracciones.

Las reacciones colorimétricas se llevaron a cabo en placas de ELISA de 48 pocillos. Para cada reacción se añadió 160  $\mu\text{l}$  de muestra a la concentración indicada, 16  $\mu\text{l}$  de ácido sulfámico, 40  $\mu\text{l}$  de carbazol y 960  $\mu\text{l}$  de bórax en ácido sulfúrico. La placa se incubó a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 50 min tras lo que se paró la reacción en hielo a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 min, y se dejó a temperatura ambiente durante otros 5 min.

La lectura de la absorbancia a 515 nm se realizó en un lector de placas multipocillos (BioTek™, Eon™).

Los resultados fueron expresados en mg de ácido galacturónico/100 mg de pared celular y en mg de ácido galacturónico/ 100 mg de fracción.

#### III.2.4.4 Cuantificación de azúcares neutros

El contenido de azúcares neutros de las fracciones se cuantificó mediante el método del orcinol (orcinol 3,5-Dihidroxitolueno 1 hidrato 0,112  $\mu\text{M}$  y ácido sulfúrico al 75 %). En este caso, para realizar la curva patrón, se usó glucosa en concentraciones 0, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Las reacciones se llevaron a cabo en placas ELISA de 96 pocillos y, en cada reacción, se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de muestra y 160  $\mu\text{l}$  de orcinol. La mezcla se incubó durante 55 min a  $100^{\circ}\text{C}$ , se paró la reacción en hielo durante 20 min, y se dejó atemperar durante otros 5 min. Posteriormente, se registró la absorbancia a 450 nm en un lector de placas multipocillos (BioTek™, Eon™).

Los resultados se expresaron en mg de glucosa/100 mg de pared celular y en mg de glucosa/100 mg de fracción.

#### III.2.4.5 Microarrays de pared celular

Se realizó un microarrays del perfil completo de polímeros (CoMPP) de las fracciones de pared celular de frutos de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y de la línea control, utilizando el protocolo descrito en Kračun et al. (2017). Las fracciones de pared celular se obtuvieron mediante homogeneización secuencial con perlas de vidrio utilizando un lisador de tejidos (Retsch MM400) para la siguiente serie de solventes: agua estéril; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M; KOH 4 M y cadoxeno (1,2-diaminoetano al 31 % con óxido de cadmio 0,78 M, v: v). En las dos fracciones alcalinas se añadió NaBH<sub>4</sub> al 0.1 % para evitar daños en la integridad de la hemicelulosa debido al poder reductor de ambos disolventes.

Para obtener la primera fracción, soluble en agua, se homogeneizaron 10 mg de extracto de la pared celular en un lisador de tejidos con 500 µl de agua a 30 Hz de agitación durante 20 minutos, seguido de una agitación suave por balanceo de 1 hora a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 2700 g durante 15 minutos, los sobrenadantes se guardaron en un tubo nuevo y se almacenaron como fracción agua, mientras que los pellets se extrajeron adicionalmente con el siguiente disolvente, siguiendo los mismos pasos de extracción. Los sobrenadantes de cada fracción se diluyeron cuatro veces (primera dilución 1:1 y las siguientes diluyendo 5 veces cada vez). Se realizaron 4 réplicas técnicas de cada muestra, dando una sub-matriz de 16 puntos por muestra.

Todas las muestras de líneas transgénicas y controles se imprimieron simultáneamente en la misma hoja de nitrocelulosa. La impresión en nitrocelulosa fue realizada por un ArrayJet Sprint (ArrayJet, Roslin, Reino Unido) y cuantificada como se describió anteriormente en el trabajo Kračun et al. (2017). De forma resumida, las hojas de nitrocelulosa impresas se sondearon con los anticuerpos monoclonales primarios diluidos (1/10) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía leche en polvo al 5 % p/v (leche/PBS). Los anticuerpos secundarios anti-rata o anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) se diluyeron (1/5000) en leche/PBS. Los mAb primarios (Tabla 3.1) utilizados en este estudio fueron cedidos amablemente por el Dr. Paul Knox integrante de la Universidad de Leeds, Reino Unido, excepto INRA-RU1 e INRA-RU2, que fueron amablemente proporcionados por la Dra. Marie Christine Ralet integrante del French National Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE), Francia (referencias anticuerpos en Tabla Suplementaria 4.1).

Tabla 3.1: Listado de anticuerpos primarios utilizados en el microarrays del perfil completo de polímeros (CoMPP) indicando el tipo de residuo de pectina principal al que se unen y el epitopo específico para el que fue diseñado.

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Epitopo</b>
Homogalacturonano (HG)	LM7	HG parcialmente metilado (no en bloques)
	LM8	Xilogalacturonano
	LM18	HG parcialmente metilado/no esterificado
	LM19	HG parcialmente metilado/no esterificado
	LM20	HG parcialmente metilado
	JIM5	HG parcialmente metilado/no esterificado
	JIM7	HG parcialmente metilado
Ramnogalacturonano 1 (RG-1)	LM5	RG-1 (1-4)- $\beta$ -D-galactano
	LM6	RG-1 (1-5)- $\alpha$ -L-arabinano
	BR12	RG-1 (1-5)- $\alpha$ -L-arabinano
	INRA-RU1	RG-1 (esqueleto)
	INRA-RU2	RG-1 (esqueleto)
	LM13	RG-1 (1-5)- $\alpha$ -L-arabinano (linealizado)
	LM16	Arabinano procesado
	LM9	Ferurorilado (1-4)- $\beta$ -D-galactano
	LM12	Pectina ferurorilada
LM26	RG1 ramificación(1,6-gal)(1-4)- $\beta$ -D-galactano	
Xiloglucano (XG)	LM15	XG (motivo XXXG)
	LM24	XG galactosilado
	LM25	XG (motivo XXXG/XG galactosilado)
Heteroxilano	LM10	(1-4)- $\beta$ -D-xilano
	LM11	(1-4)- $\beta$ -D-xilano/arabinoxilano
	LM23	xilosil no acetilado en xilogalacturonano
	LM27	HX de monocotiledóneas
	LM28	glucuroxilano
Hetero-mannan	LM21	Hetero-mannan
	LM22	Hetero-mannan
Extensina	LM3	Extensinas
	JIM11	Extensinas
	JIM20	Extensinas
Proteína arabinogalactano (AGP)	LM2	GlcA unido por enlace $\beta$ a AGP
	JIM13	Proteínas arabinogalactanos
	JIM14	Proteínas arabinogalactanos
	JIM15	Proteínas arabinogalactanos
	JIM16	Proteínas arabinogalactanos
	PDT8	Proteínas arabinogalactanos

Los microarrays sondeados se escanearon (CanoScan 8800F), las imágenes obtenidas se convirtieron a formato TIFF y las señales se procesaron con el software de análisis de microarrays ImaGene 6.0 (BioDiscovery) siguiendo las indicaciones

publicadas por Moller et al. (2007). Las señales medias de las réplicas técnicas y biológicas se representaron en una representación de mapa de calor o "Heat map" en el que la intensidad del color se correlaciona con la intensidad de la señal registrada. El valor de la señal más alta se estableció en 100 y todos los demás valores se normalizaron en consecuencia.

#### III.2.4.6 Ensayo inmunofluorescente en tejido histológico

##### - III.2.4.6.1 Preparación del material vegetal y fijación

Se cortaron secciones de frutos rojos de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y de la línea control con forma de cubo rectangular de 1 cm de largo, incluyendo la zona del parénquima y de los haces vasculares. Cada fruto representó una réplica biológica, usando 3 réplicas biológicas en cada línea.

Los cubos cortados fueron introducidos inmediatamente en paraformaldehído al 4 % disuelto en tampón PEM (PIPES (piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico]) 50 mM, EGTA (etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N, N, N', N'-ácido tetraacético) 5 mM y sulfato de magnesio 5 mM, ajustando la mezcla a pH 6,9 con hidróxido de sodio). Este y los siguientes pasos se realizaron en campana de extracción de gases y con el equipo de protección personal adecuado.

Los cubos sumergidos en la mezcla de paraformaldehído en tampón PEM fueron sometidos a vacío durante 1 min para eliminar posibles burbujas en los tejidos. En este paso se tuvo la precaución de no cambiar la presión bruscamente, para evitar alteraciones en la estructura de los tejidos. Tras restituir la presión atmosférica, se incubaron a 4 °C durante 8 horas. El proceso se repitió 2 veces más renovando el paraformaldehído diluido en tampón PEM cada vez.

##### - III.2.4.6.2 Deshidratación

Tras la fijación se procedió a una deshidratación progresiva de los tejidos, incubándolos en diferentes concentraciones crecientes de etanol. La incubación, a 4 °C, se mantuvo al menos 1 hora, para cada paso de la serie de etanol al 20, 30, 50, 70, 80, 90 y 100 %.

##### - III.2.4.6.3 Inclusión en resina

El tejido deshidratado se incluyó en resina, renovando previamente el etanol 100 % con un volumen de 1,5 mL en un tubo de vidrio. A este volumen se le fue aumentando progresivamente la concentración de resina LR White (Agar Scientific). Primero se le añadieron 170  $\mu$ L (10 %), después 205  $\mu$ L (20 %), 268  $\mu$ L (30 %), 857  $\mu$ L (50 %), 2 mL (70 %) y, finalmente, cambio de la mezcla por resina 100 %. La resina 100 % se renovó 1 vez más. Entre cambio y cambio se dejaron al menos 2 horas de incubación, siempre a 4 °C. En todos los tratamientos se dio una agitación muy suave para homogenizar la mezcla sin dañar la muestra.

El último paso consistió en introducir las muestras en cápsulas de gelatina (Agar Scientific) previamente rellenas de resina 100 %. Tras cerrar las cápsulas, se introdujeron en un horno a 50 °C durante 24 horas para que la resina pudiera polimerizar solidificándose.

- III.2.4.6.4 Corte histológico

Los bloques incluidos en resina se enviaron a los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga para la preparación de cortes semifinos con ultramicrotomo (Leica EM UC7). Dichos cortes fueron montados en portaobjetos previamente silanizados (siguiente apartado), para asegurar una buena adherencia, con capacidad para 6 cortes histológicos (Marienfeld).

- III.2.4.6.5 Silanización de portaobjetos

Para la silanización de los portaobjetos se colocaron en un soporte de metal, y se introdujeron en acetona durante 5 min. El soporte se golpeó suavemente para retirar el exceso de acetona tras el tiempo de incubación, y se introdujo rápidamente en otra cubeta con el Vectabond diluido para incubarlo de nuevo durante 5 min. Para la silanización se usó el reactivo Vectabond (Vector laboratories), diluyendo 7 mL en 350 mL de acetona.

Tras la incubación, se eliminó el exceso de Vectabond en los portaobjetos y se pasó rápidamente a otra cubeta con agua destilada para ser incubados durante 30 s. Tras este tiempo, el último paso realizado fue secar los portaobjetos a 37 °C durante 1 hora. Tras el secado los portaobjetos estaban listos para poder adherirles cortes semifinos incluidos en resina aplicando calor.

- III.2.4.6.6 Ensayo inmunofluorescente en tejidos histológicos

Se realizó un ensayo inmunofluorescente en cortes histológicos, incluidos en resina, de frutos rojos de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control. Para ello se rodeó cada sección histológica en el portaobjetos con el *Liquid Blocker Super Pad Pen* (Fisher Scientific), evitando cruce de reacciones entre las diferentes secciones de un mismo portaobjetos. A cada sección se le añadieron 30 µL de leche en polvo al 5 % disuelta en tampón PBS (leche/PBS), incubándose los portaobjetos a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación, se lavó el portaobjetos con tampón PBS. Para ello, con una pipeta Pasteur se echó bastante PBS por encima del portaobjetos (hasta que no quedaron restos de leche/PBS) y se le añadió PBS a cada sección, dejándolo incubar durante 5 min. Tras repetir este lavado dos veces más se eliminó el exceso de PBS golpeando suavemente los portaobjetos contra papel secante.

Una vez los portaobjetos estaban secos se le añadió a cada sección el anticuerpo monoclonal primario con una dilución 1/5 en leche/PBS. Esta reacción se dejó incubando 90 min a temperatura ambiente en oscuridad. Los anticuerpos primarios usados fueron: LM5 (galactanos unidos al esqueleto de RG-1), LM6 (arabinanos unidos al esqueleto de RG-1), LM19 (HG parcialmente metilado con bajo grado de

esterificación), LM26 (galactosa de las ramificaciones de RG-1), JIM5 (HG parcialmente metilado con bajo grado de esterificación), JIM7 (HG parcialmente metilado con alto grado de esterificación) e INRA-RU1 (esqueleto de RG-1).

Tras la incubación los portaobjetos fueron lavados 3 veces con PBS y secados como se describió anteriormente. Una vez secados los portaobjetos se añadió a cada sección el anticuerpo secundario (anti-rata en todos los casos, salvo en el INRA-RU1 que se usó anti-ratón) diluido, 1/100 en el caso de anti-rata y 1/50 en el caso de anti-ratón, en leche/PBS. Los anticuerpos secundarios iban unidos a la molécula isotiocianato de fluoresceína (FITC), la cual se excita si recibe luz con una longitud de onda de 492 nm, y emite luz de una longitud de onda de 518 nm.

Tras una incubación de 60 min a temperatura ambiente en oscuridad, los portaobjetos se volvieron a lavar 3 veces con PBS y a secar, para añadir a cada sección calcoflúor (0,25 mg/mL en PBS) con una pipeta Pasteur, incubándose durante 5 min en oscuridad a temperatura ambiente. El calcoflúor se adhiere a la celulosa y emite fluorescencia a 475 nm cuando recibe luz de 380 nm, sirviendo de testigo (las muestras tienen mucha celulosa).

Por último, tras 2 lavados con PBS, se montaron los cubreobjetos en los portaobjetos con Citifluor (ayuda a conservar la fluorescencia) y se conservaron a 4 °C en oscuridad hasta su visualización (el máximo tiempo transcurrido entre el ensayo inmunofluorescente y su visualización fue de 4 días).

La fluorescencia indirecta emitida por la inmunolocalización fue observada con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 y fotografiada con una cámara Leica DFC450 C.

#### - III.2.4.6.7 Cuantificación de la inmunofluorescencia

Para la cuantificación de la fluorescencia en las imágenes se usó la extensión del programa "Image J" "Fiji", utilizando fotografías en formato .tiff y preparadas de la siguiente forma:

- 1- Se hizo una separación por canales de color (Image - color - split channel)
- 2- Se seleccionó la ventana del canal verde y se cambió la imagen a 8 bits (Image - type - 8bits)
- 3- Se duplicó esta imagen (Image - duplicate) y se renombró añadiendo al final "copy" para distinguirla de la original

Con esta copia de la imagen se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- 1- En este primer paso se eliminaron artefactos de la imagen, para ello se siguió la siguiente ruta: Proceed - FFT - Bandpass Filter seleccionando el rango entre 40 y 10 pixels y un 5% de tolerancia. Se seleccionaron las pestañas de "autoscale after filtering" y "saturate image when autoscaling".

2- Se seleccionó sólo un color determinado de la foto: Image - Adjust - Auto threshold seleccionando el método "Li" y las opciones "Ignore black" y "White objects on black background".

3- Se seleccionó el área que mostraba señal, para ello era necesario tener abiertas la imagen original y la copia. Se hizo el siguiente procedimiento sobre la imagen "copy": Edit - Selection - Create selection para seleccionar el área con señal, y luego con la imagen original se siguió la ruta: Edit - Selection - Restore selection

4- En este punto nos quedaba cuantificar dicha señal, para ello: Analyze - Set measurements y se seleccionaron area, standard deviation, min y max gray value, integrated density, mean gray value y display label.

5- Se generó una tabla con diferentes valores, de los cuales nos interesaba el "Area" y "RawIntDen", que nos indican el área de la imagen que tiene señal y la cantidad de señal medida en unidades arbitrarias en una escala de 0 a 255 respectivamente, por lo que haciendo el ratio RawIntDen/Area obtuvimos la fluorescencia/píxel.

### III.2.5 Análisis estadístico y representación de gráficos

Para el análisis estadístico se usó el programa IBM SPSS Statistics 22.0. Para la representación de gráficas se usó Microsoft Excel 2010 y para el diagrama de Venn se usó la aplicación web Venny 2.1.0 (creada por Juan Carlos Oliveros, <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

### III.3 Resultados

#### III.3.1 Análisis del fenotipo de los frutos obtenidos de las líneas con el gen *FaRGlyase 1* silenciado

El fenotipado de los frutos producidos por las 2 líneas independientes de plantas *Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler' con el gen *FaRGlyase 1* silenciado obtenidas y seleccionadas como se indica en el apartado III.2.1 de Materiales y Métodos (FaRG 26 y FaRG 87) se realizó en frutos de estadio maduro.

Tanto a los frutos cosechados de ambas líneas FaRG 26 y FaRG 87 como a los frutos control no transformados recogidos en los mismos días se les midió la longitud, la anchura y la firmeza y, además, se cuantificó la cantidad de sólidos solubles y el peso. Los frutos de ambas líneas transgénicas mostraron diferentes tendencias en cuanto al tamaño se refiere con respecto a los frutos control. Los frutos de la línea FaRG 26 fueron más pequeños, y esto fue reflejado en una reducción significativa del peso y de la longitud, no así en la anchura. La reducción del peso de los frutos de la línea FaRG 26 fue de 1 g aproximadamente, mientras que la reducción de la longitud fue de algo más de 0,5 cm. Los frutos procedentes de la línea FaRG 87 mostraron un tamaño similar que los frutos control, no mostrando diferencias significativas en ninguna de las tres variables comentadas, siendo el peso cercano a 10 g, la longitud de los frutos estuvo en torno a 3,25 cm y la anchura a 2,25 cm (Figura 3.1).

Esta tendencia diferente de los frutos de ambas líneas transgénicas al ser comparados con los frutos control también se observó al comparar la cantidad de sólidos solubles. En esta variable, los frutos de la línea FaRG 87 mostraron una reducción significativa con respecto a los frutos control, en torno a 1 °Bx menos, mientras que los frutos de la línea FaRG 26 no mostraron diferencias significativas, mostrando un valor aproximado de 8 °Bx (Figura 3.2).

En cuanto a la medición de color, los frutos de las líneas transgénicas tampoco obtuvieron los mismos resultados al comparar las diferentes variables de los espacios de color CIELAB y CIELCh. Los frutos de la línea FaRG 26 sólo mostró un aumento significativo de la variable L\* (luminosidad) con respecto a los frutos no transgénicos, mientras que los frutos de la línea FaRG 87 no mostraron diferencias en ninguna variable cuantificada con respecto a los frutos control (Figura 3.3).

La firmeza fue la única variable en la que los frutos procedentes de ambas líneas transgénicas mostraron una comparación similar con respecto a los frutos control. Los frutos de ambas líneas transgénicas presentaron un aumento significativo en la firmeza con respecto a los frutos control. La firmeza media cuantificada en los frutos de la línea FaRG 26 fue de 450 g aproximadamente, la de los frutos procedentes de la línea FaRG 87 fue cercana a 400 g y la de los frutos no transgénicos no llegó a 350 g (Figura 3.4).

En cuanto al desarrollo y la maduración de los frutos de las líneas FaRG26 y FaRG87 fue similar al de los frutos control no transformados, mostrando una pigmentación homogénea. El tiempo de maduración y desarrollo varió dependiendo del mes en el que se realizara el ensayo, pero en la mayoría de los casos no se registraron cambios importantes (Figura 3.5).

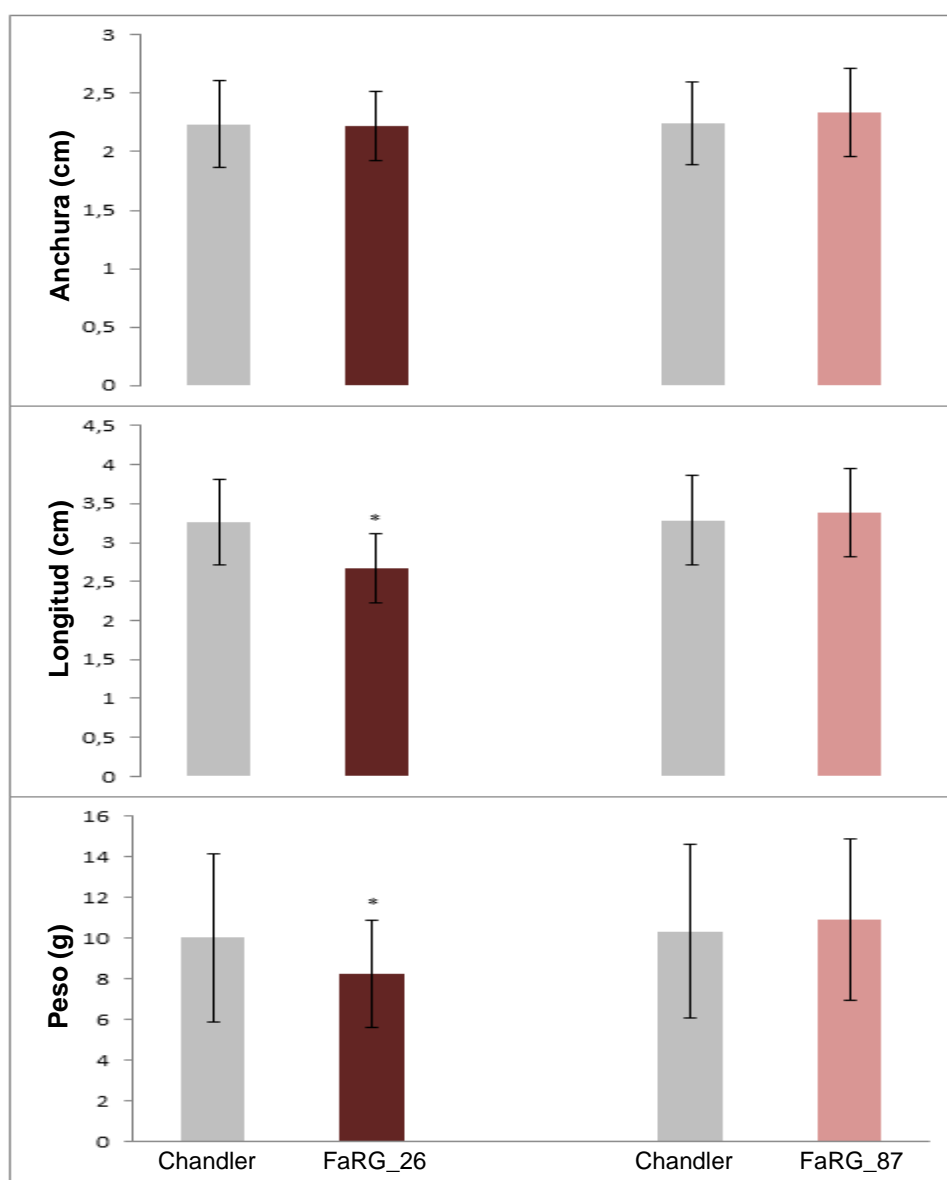


Figura 3.1: Peso en gramos, longitud y anchura en centímetros, de los frutos FaRG silenciado junto con los frutos no transformados recolectados los mismos días. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a los frutos control tras la prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), a excepción de la comparación de medias poblacionales de la longitud de los frutos de la línea FaRG 26 y la línea control, que se hizo mediante una prueba T ( $p < 0,05$ ).

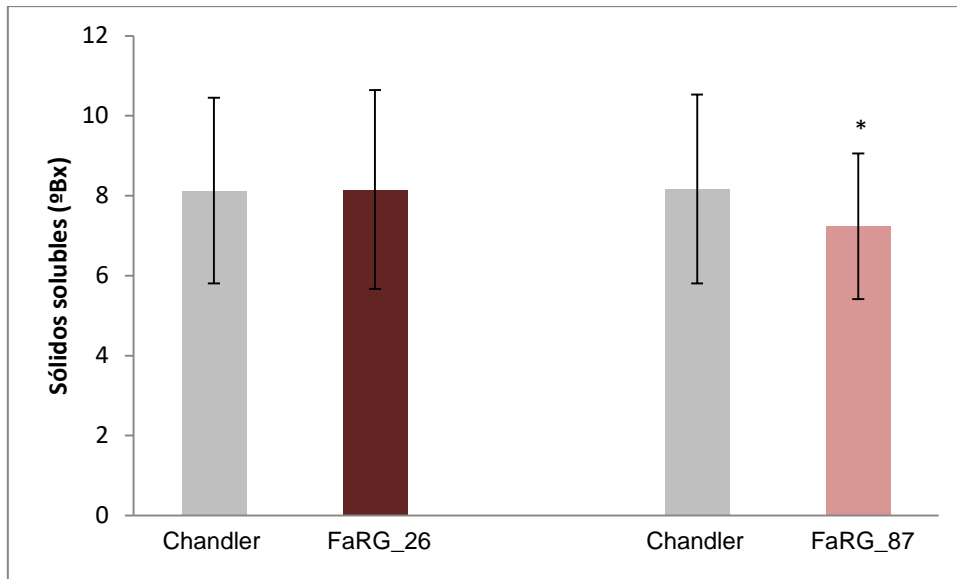


Figura 3.2: Cantidad de sólidos solubles en grados Brix (°Bx) de los frutos procedentes de las líneas FaRG junto a sus controles. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a la línea control tras la prueba U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

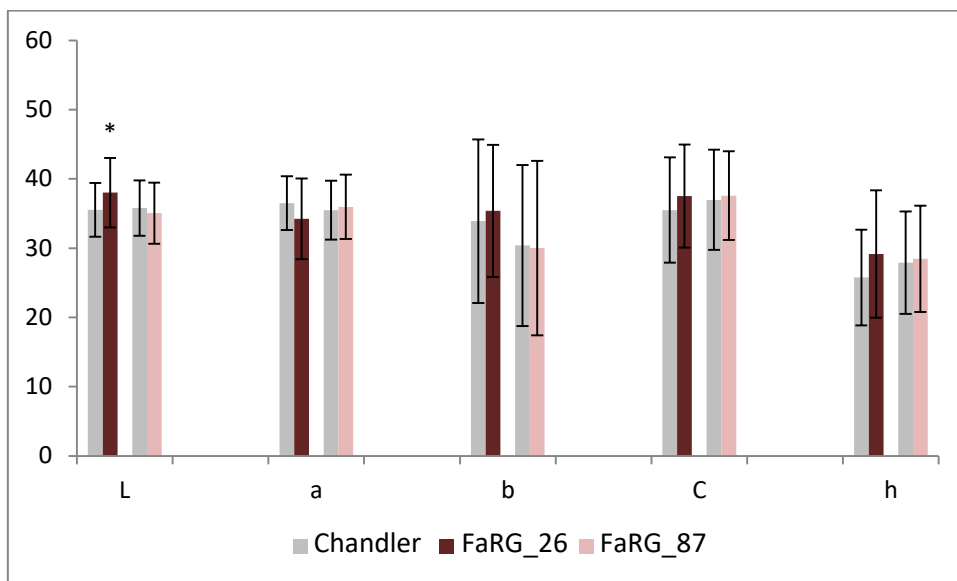


Figura 3.3: Cuantificación del color de los frutos en el espacio de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C y h) en las líneas FaRG con sus respectivos controles. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al control tras pruebas U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), salvo para la variable  $L^*$  en ambas líneas y en la variable  $a^*$  en la línea 87, para las que se realizaron pruebas T ( $p < 0,05$ ).

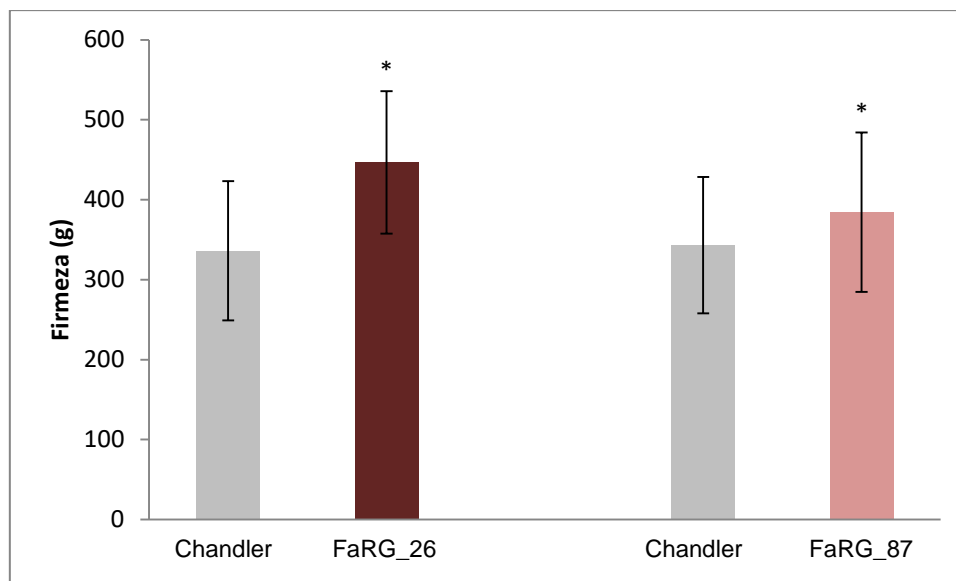


Figura 3.4: Firmeza en gramos de los frutos FaRG junto con la de los respectivos controles. Para la línea FaRG 26 se realizó una prueba U de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), para la línea 87 se usó la prueba T ( $p < 0,05$ ). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a la línea control.

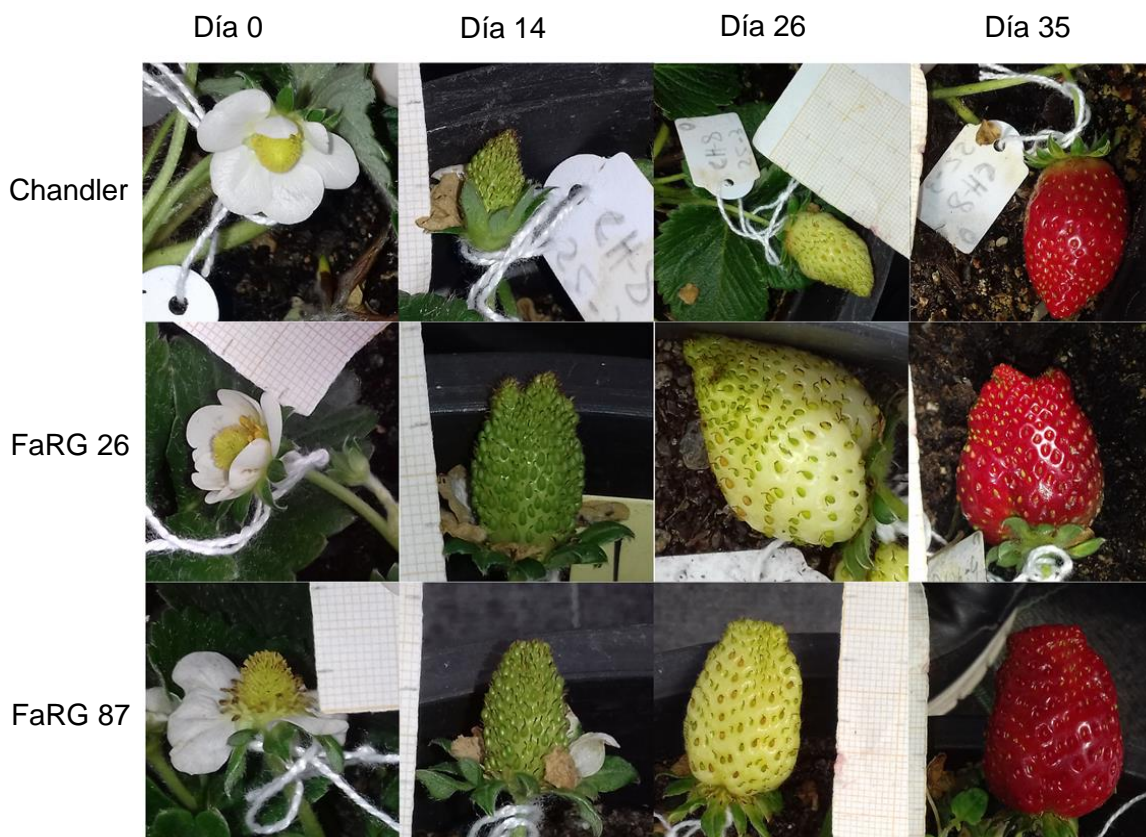


Figura 3.5: Desarrollo de frutos de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control sin transformar Chandler registrado mediante fotografías tomadas en diferentes días tras la antesis de la flor.

### III.3.2 Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN

Los perfiles de expresión génica global de los frutos en estadio maduro de las líneas FaRG y la línea control se caracterizaron mediante secuenciación masiva de ARN. Antes de analizar los resultados de este estudio se comprobó que el ensayo era reproducible atendiendo a una serie de parámetros. Estos parámetros mostraron valores similares en las 3 réplicas de las 3 líneas analizadas. Uno de ellos es la tasa de error de las bases, la cual tomó como valor máximo 0,02. Otro aspecto fue que al menos el 96 % de bases presentaron más del 99 % de tasa de reconocimiento (parámetro Q20), y más de un 90 % de las bases un 99,9 % de tasa de reconocimiento (parámetro Q30). Además, el porcentaje de GC se situó en torno al 45 % en todas las réplicas de las muestras, siendo registradas de forma uniforme durante la secuenciación (<https://drive.google.com/drive/folders/1QABs8i-pguk03TPYRcp8Kc9YL6nX174y?usp=sharing>). Por otro lado, en torno al 50 % de las lecturas fueron mapeadas con éxito y, tan sólo, el 1 % aproximadamente presentaron un mapeado múltiple, excepto en la réplica B de la línea FaRG 87 que fue de 2,39 %. Por último, los coeficientes de Pearson mostraron una correlación de al menos 0,946 entre réplicas ([https://drive.google.com/file/d/1PhRTNGkEN-Dm\\_ednWwW2YHD4jKOaY-dB/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1PhRTNGkEN-Dm_ednWwW2YHD4jKOaY-dB/view?usp=sharing)).

Mediante la comparación de los niveles de expresión de cada gen respecto al control, aplicando un análisis de abundancia de la transcripción mediante el algoritmo DESeq (Anders y Huber, 2010), con un valor umbral de 50 % de expresión diferencial y 0,05 para el valor de significación (e-value corregido/ajustado), se determinaron aquellos genes sobreexpresados o reprimidos en frutos maduros de las líneas FaRG respecto frutos de la línea control. Así, se observó una reducción de la expresión de 20 genes en los frutos analizados procedentes de la línea FaRG 26 y un aumento en la expresión de 94 genes (Tabla Suplementaria 3.1). Los frutos de la línea FaRG 87 mostraron una reducción en la expresión de 8 genes y un aumento en la expresión de 4 genes (Tabla Suplementaria 3.2). De los genes que vieron disminuida su expresión, tan solo 2 (FvH4\_1g03290.1 y FvH4\_1g03300.1) fueron comunes en frutos de ambas líneas, siendo ambos genes codificantes de ramnogalacturonano endoliasa del tipo RGL4, teniendo ambas una alta similitud de secuencia a la descrita en *Fragaria chiloensis* en el trabajo de Méndez-Yañez et al. (2020). Ambos genes presentaron en los frutos de ambas líneas al menos un 80 % de reducción en la transcripción con respecto al nivel de expresión en los frutos de la línea control. Dos fueron también los genes comunes en frutos de ambas líneas que mostraron un aumento de la transcripción (FvH4\_5g29210.1 y FvH4\_6g39920.1), siendo ambos genes de función desconocida en fresa. Por similitud, FvH4\_5g29210.1 codifica una proteína que no está caracterizada y FvH4\_6g39920.1 codifica a una proteína con un dominio de unión al ADN tipo MYB de función desconocida (Figura 3.6).

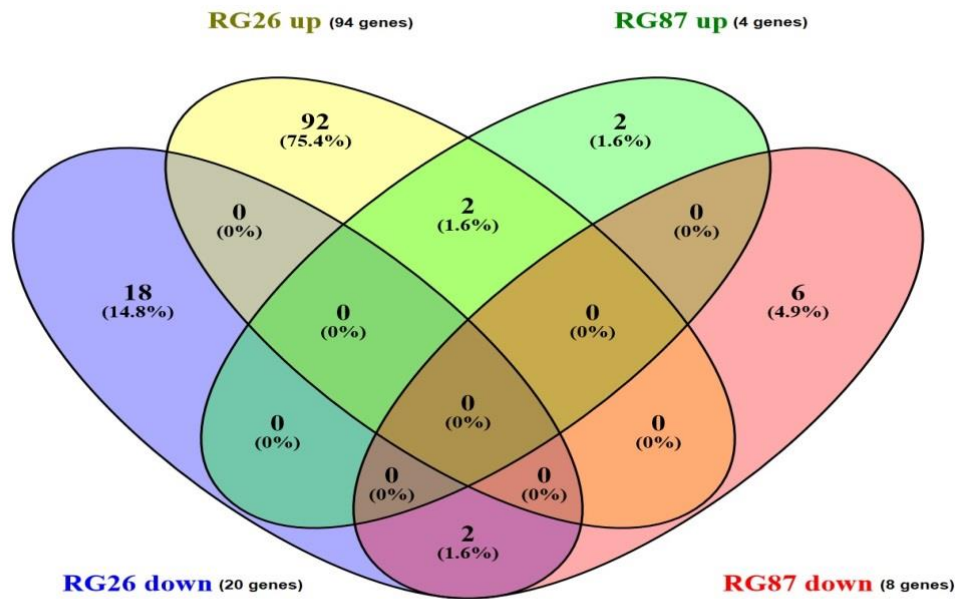


Figura 3.6 Diagrama de Venn donde se representan los genes sobreexpresados (up) y silenciados (down) en las líneas FaRG 26 y 87, con respecto a la línea control. La zona amarilla representa los genes sobreexpresados exclusivamente en la línea 26, la zona verde los sobreexpresados solo en la línea FaRG 87, la zona azul los reprimidos en la línea 26 y la zona roja los reprimidos de la línea 87. Las zonas representadas con los demás colores indican los genes diferencialmente expresados comunes a las dos líneas modificadas.

De los 6 genes restantes que mostraron una reducción diferencial en la transcripción en los frutos de la línea FaRG 87, 3 codifican a proteínas que no han sido caracterizadas, ni tienen similitud con proteínas de función conocida. Los otros 3 genes codifican una posible proteína de pared celular rica en prolina (FvH4\_7g02540.1; *predicted: repetitive proline-rich cell wall protein 1-like*), un posible homólogo de formina, que actúa en la reorganización del citoesqueleto de actina (FvH4\_5g24610.1; *predicted: formin-like protein 3*) y un posible transportador de zinc (FvH4\_3g36840.1; ZIP2 o AT5G59520.1 en *Arabidopsis*). En cuanto a los 2 genes que mostraron un aumento en la transcripción, no comunes con los frutos de la línea FaRG 26, ambos codifican proteínas no caracterizadas ni en fresa ni en otro organismo registrado en las bases de datos.

En cuanto a los genes que mostraron expresión diferencial en frutos de la línea FaRG 26 no comunes con los comentados en frutos de FaRG 87, codifican un grupo muy diverso de proteínas. Entre los genes que vieron aumentada su transcripción y pueden estar involucrados en alteraciones del fenotipo de los frutos de la línea FaRG 26 cabe destacar: genes codificantes de posibles proteínas involucradas en respuestas frente a estrés biótico o abiótico, como 2 genes que codifican proteínas que podrían estar involucradas en la respuesta mediada por etileno, FvH4\_3g08290.1 (*predicted:*

*ethylene-responsive transcription factor 2-like* en *Fragaria vesca*) y FvH4\_7g26920.1 (codificante de una proteína con un 70 % de similitud con *ethylene response factor ERF2* de la planta *Eriobotrya japónica*, perteneciente a la familia *Rosaceae*); 8 genes que codifican posibles proteínas que han sido relacionadas con respuestas frente a patógenos (FvH4\_3g26010.1, FvH4\_4g19050.1, FvH4\_4g19060.1, FvH4\_4g19070.1, FvH4\_4g19080.1, FvH4\_4g19700.1, FvH4\_6g16950.1 y FvH4\_6g38750.1); 2 genes codificantes de posibles aldehídos deshidrogenasas involucradas en respuesta frente a patógenos y relacionadas con la biosíntesis de flavonoides (FvH4\_1g05080.1 y FvH4\_1g05100.1); y un gen codificante de una proteína con más del 99 % de similitud con *heat shock factor B3a* en *Fragaria vesca*, involucrada en la respuesta frente a estrés por calor (FvH4\_6g24120.1). Genes codificantes de posibles proteínas involucradas en el transporte de azúcares como FvH4\_4g15150.1, codificante de una probable *sugar transport protein 13*, y FvH4\_7g27120.1, codificante de una posible *hexose carrier protein HEX6-like*, ambas predicciones realizadas en *F. vesca*. Por último, destacar un gen codificante de una proteína con un 80 % de similitud con *Actin-depolymerizing factor 7* en *Arabidopsis thaliana* según la base de datos ExPASy Swiss-Prot (FvH4\_5g02050.1), estando esta proteína involucrada en la reorganización de las microfibrillas de actina durante el crecimiento celular. En cuanto a los 18 genes que vieron reducida su transcripción exclusivamente en los frutos de la línea FaRG 26 cabe destacar FvH4\_4g01980.1, gen codificante de una probable *3-ketoacyl-CoA synthase 11-like* en *F. vesca*, siendo esta proteína relacionada con alteraciones en composición de ceras de frutos y hojas.

### III.3.3 Caracterización de la pared celular de los frutos transgénicos

Tras la extracción y liofilización de la pared celular de los frutos de las tres líneas analizadas, se pesaron, con el fin de comparar los rendimientos obtenidos de pared celular. Tanto frutos de la línea FaRG 26 como FaRG 87 no mostraron diferencias significativas en los pesos de sus paredes celulares con respecto a los de la línea control, teniendo unos valores cercanos a 90 mg (Figura 3.7).

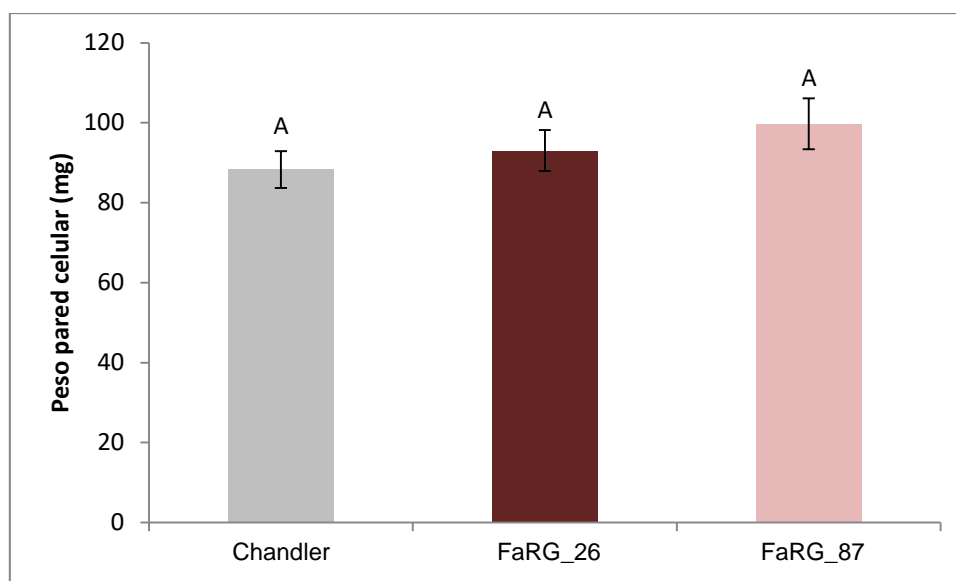


Figura 3.7: Peso de la pared celular liofilizada obtenida (mg) de los frutos en estadio maduro de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control partiendo de 10 g de fruto (n = 4). No se encontraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tras el fraccionamiento de las paredes celulares y su posterior liofilización, se pesaron, para comparar los rendimientos de las diferentes fracciones entre las diferentes líneas.

En la fracción PAW, donde se extraen las pectinas solubilizadas en la lámina media, se obtuvo un mayor rendimiento en los frutos de las dos líneas FaRG que en los de la línea control. En la fracción agua, enriquecida en pectinas débilmente unidas, los frutos de la línea FaRG 26 fueron los que mostraron el mayor rendimiento de las 3 líneas analizadas, mientras que los frutos de la línea FaRG 87 tuvo un rendimiento intermedio entre el mostrado por frutos de FaRG 26 y por frutos testigo. Sin embargo, al comparar rendimientos en las fracciones CDTA (pectinas retenidas por fuerzas iónicas) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pectinas unidas fuertemente a la lámina media) frutos de la línea FaRG 87 fueron los que obtuvieron valores más altos, siendo dicha diferencia significativa con respecto a los frutos de la línea control, mientras que los frutos de la línea FaRG 26 no mostraron diferencias significativas, posicionándose en un lugar intermedio. El rendimiento de los frutos de ambas líneas transgénicas en las fracciones KOH (componentes unidos fuertemente a la pared celular primaria) no mostró diferencias significativas con respecto a los de la línea control (Figura 3.8).

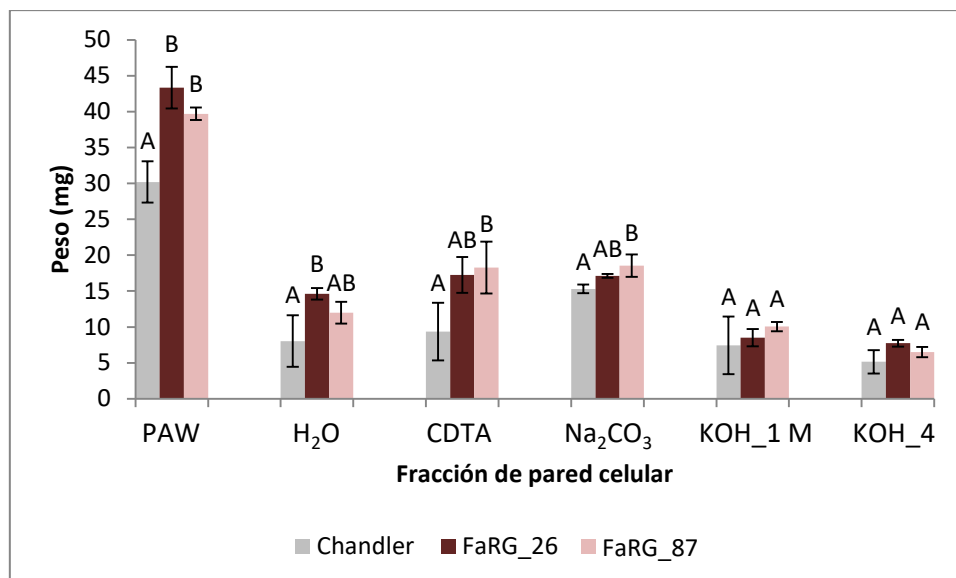


Figura 3.8: Peso (mg) de las fracciones liofilizadas PAW, H<sub>2</sub>O, CDTA, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 1 M y KOH 4 M de las paredes celulares de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control obtenidas a partir de 150 mg de pared celular liofilizada (n = 3). Dentro de cada fracción, muestras con la misma letra no mostraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey (p < 0,05), salvo en la fracción KOH 4 M para la que se realizó una prueba Tamhane (p < 0,05).

En cuanto a la cantidad de azúcares ácidos, los resultados de la prueba con carbazol se representaron en mg de ácido galacturónico por 100 mg de pared celular (Figura 3.9A), y también en mg de ácido galacturónico por 100 mg de fracción (Figura 3.9B). Al representarlo por 100 mg de fracción, no hubo diferencias entre los frutos de las líneas transgénicas y los de la línea control en ninguna fracción de la pared celular. Sin embargo, al representarlo por 100 mg de pared celular, los frutos de las dos líneas transgénicas tienen más cantidad de ácido galacturónico que los de la línea control en las fracciones PAW (pectinas solubles en la lámina media), H<sub>2</sub>O (pectinas retenidas débilmente en la lámina media) y CDTA (pectinas retenidas por fuerzas iónicas en la lámina media).

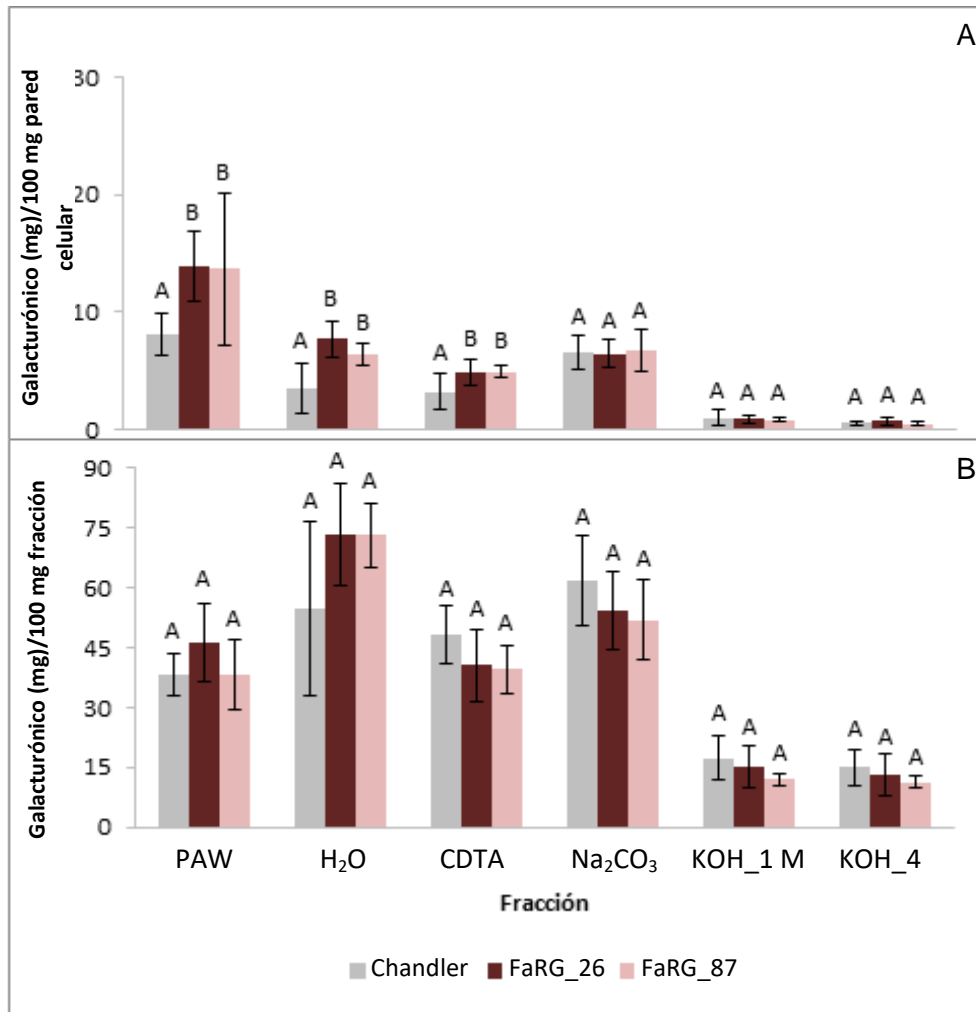


Figura 3.9: Cantidad de ácido galacturónico (mg) por cada 100 mg de pared celular (A) o por cada 100 mg de fracción (B) de frutos de las líneas con el gen FaRG silenciado y de la línea control. Dentro de cada fracción, muestras con la misma letra no mostraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

La cantidad de glucosa (azúcar neutro) en las fracciones de los frutos de las líneas transgénicas y en las de la línea control, estimada mediante la prueba con orcinol, se representaron en mg de glucosa por 100 mg de pared celular (Figura 3.10A) y por 100 mg de fracción (Figura 3.10B). En ambas representaciones los frutos de las líneas transgénicas con el gen FaRG silenciado no mostraron diferencias significativas con respecto a los de la línea control en ninguna de las fracciones de la pared celular.

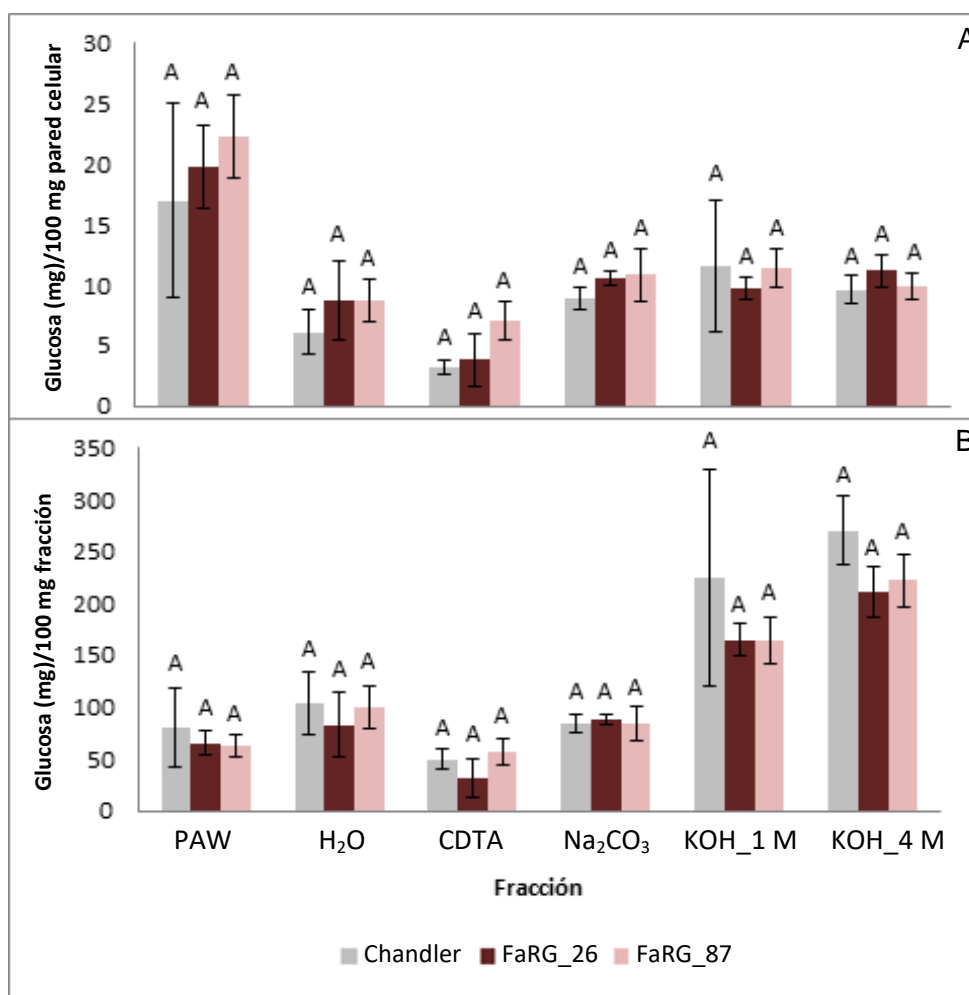


Figura 3.10: Cantidad de glucosa (mg) por cada 100 mg de pared celular (A) o 100 mg de fracción (B) de frutos de las líneas con el gen *FaRG* silenciado y de la línea control. Dentro de cada fracción, muestras con la misma letra no mostraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey ( $p < 0,05$ ), salvo en las fracciones Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 1 M y KOH 4 M del gráfico A en las que se realizó una prueba de Tamahane ( $p < 0,05$ ) y en las fracciones KOH 1 M y KOH 4 M del gráfico B en las que se hizo una prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Para analizar posibles cambios en la composición de la pared celular de ambas líneas transgénicas silenciadas en el gen *FaRGlyase 1*, se realizó un microarray con anticuerpos monoclonales específicos de diferentes componentes de la pared celular (Figura 3.11; los anticuerpos que no emitieron señal no se incluyeron en la representación). Los frutos de las líneas FaRG 26 y FaRG 87 mostraron un aumento en la cantidad de la mayoría de los diferentes componentes relacionados con el ramnogalacturonano 1 (RG-1) con respecto a la línea control: el esqueleto (INRA-RU1 e INRA-RU2), los arabinanos de las ramificaciones (BR12 y LM6), y los galactanos (LM5) en todas las fracciones analizadas, siendo mayor diferencia de señal en las fracciones Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y KOH 4 M. Los arabinanos linealizados y los residuos de galactosa que ramifican a los galactanos, detectados por los anticuerpos monoclonales LM 13 y LM 26 respectivamente, reportaron más señal en los frutos transgénicos de ambas líneas que en los frutos control en las fracciones Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 4 M y cadoxeno,

siendo más importante esta diferencia en la fracción KOH 4 M. Estos anticuerpos apenas reportaron señal en la fracción H<sub>2</sub>O de los frutos de las tres líneas analizadas. Los frutos de ambas líneas transgénicas también mostraron un aumento en la cantidad de señal procedente de homogalacturonano (HG) con alto grado de esterificación, detectado por el anticuerpo monoclonal JIM 7, en la fracción H<sub>2</sub>O, siendo esta fracción la única donde se detectó señal con este anticuerpo. Por el contrario, la señal emitida por el HG con bajo grado de esterificación, detectado por JIM 5 y LM 18, en la fracción H<sub>2</sub>O fue menor en los frutos transgénicos de ambas líneas que en el control. El anticuerpo LM 19, cuyo epitopo también se encuentra en HG de bajo grado de esterificación, no emitió señal en esta fracción de ninguna línea. Esta tendencia en los niveles de HG de bajo grado de esterificación se invirtió en el resto de fracciones, siendo la señal mayor en los frutos transgénicos de ambas líneas que en los frutos control.

Los diferentes componentes hemicelulósicos analizados (XG, xilanos y glucuronoxilanos) solo fueron detectados en las fracciones KOH 4 M y cadoxeno. Los motivos XXXG y XXXG galactosilado de los XG, detectados por los anticuerpos monoclonales LM 15 y LM 25, no mostraron diferencias de señal importantes entre las diferentes líneas analizadas. Los epitopos de xilanos y arabinoxilanos detectados por los anticuerpos monoclonales LM 10 y LM 11, apenas reportaron señal, mostrándose un ligero incremento de señal en las fracciones KOH 4 M y cadoxeno de los frutos control. Los glucuronoxilanos, detectados por el anticuerpo monoclonal LM 28, sí mostraron diferencias de señal importantes entre las fracciones KOH 4 M y cadoxeno de los frutos control y de los frutos transgénicos de ambas líneas, siendo en los frutos control una señal muy intensa y en los frutos transgénicos de ambas líneas apenas detectable.

En cuanto a las proteínas de pared celular, los epitopos de extensinas detectados por el anticuerpo monoclonal JIM 20, mostraron una señal muy baja en todas las fracciones, siendo nula en la fracción H<sub>2</sub>O. Estas bajas señales en las fracciones Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 4 M y cadoxeno de los frutos de ambas líneas transgénicas fueron ligeramente más intensas que en las de los frutos control. El epitopo específico de ácidos urónicos en proteínas arabinogalactanos detectado por el anticuerpo LM 2 siguió un patrón de señal similar al comentado con el anticuerpo específico de extensinas JIM 20. Otros epitopos de AGP, detectados por los anticuerpos monoclonales JIM 13 y PDT8, mostraron diferencias de señal importantes entre los frutos de ambas líneas transgénicas y los frutos control, siendo en los frutos transgénicos de ambas líneas una señal mucho más intensa que en los frutos control. Esta diferencia de intensidad se aprecia en todas las fracciones analizadas, siendo en la fracción KOH 4 M donde se hace más patente este hecho.

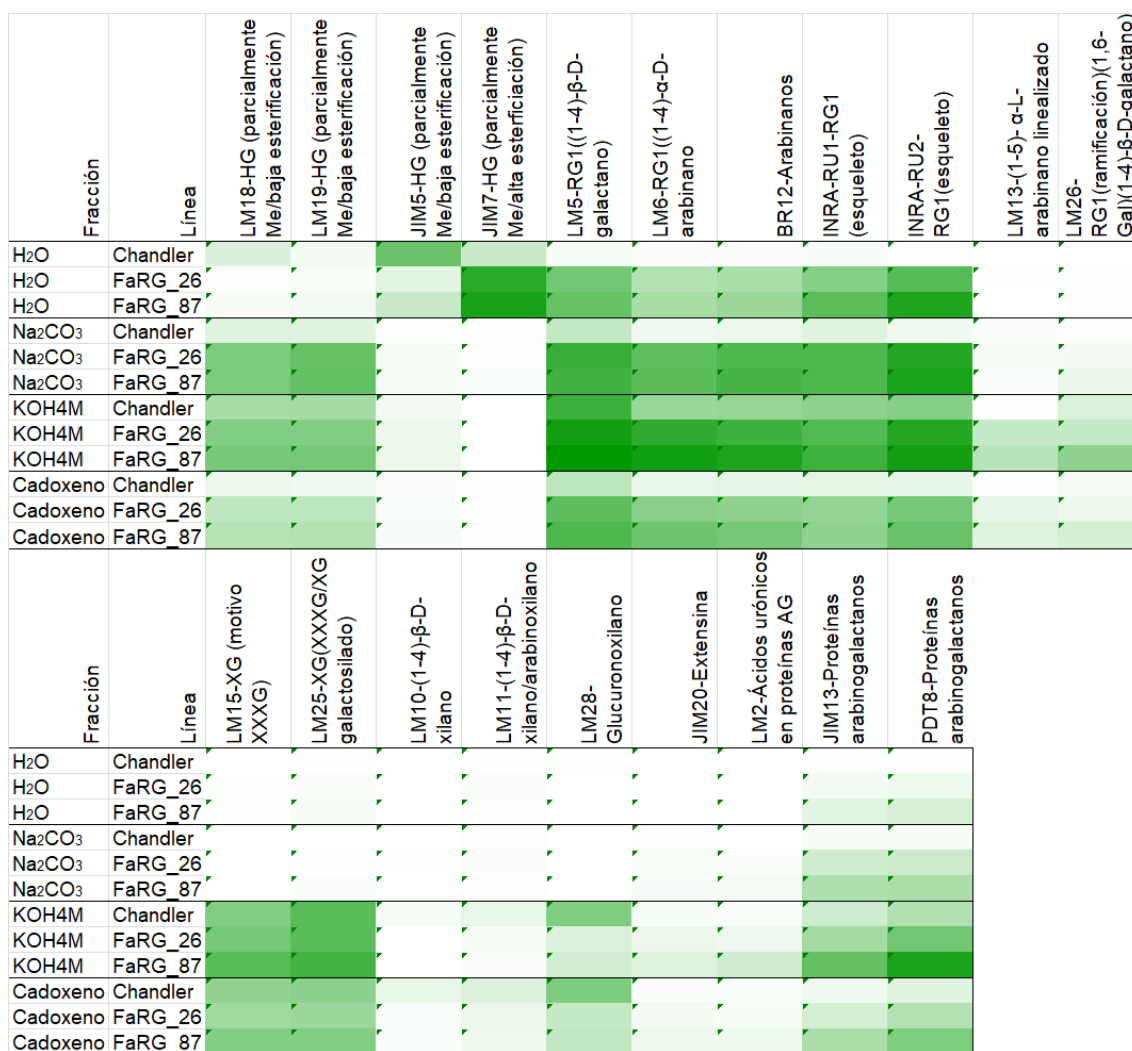


Figura 3.11: Representación de la intensidad relativa de anticuerpos monoclonales específicos de epitopos de pared celular. Este ensayo se hizo con pared celular fraccionada (H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH 4 M y cadoxeno) procedente de frutos rojos de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control.

Como prueba complementaria al microarray realizado, se hicieron ensayos inmunoenzimáticos en secciones de fruto rojo incluidos en resina de las líneas FaRG y de la línea control. Este ensayo nos permite ver si además de cambios en la composición de la pared celular, hay cambios en la distribución de los diferentes componentes analizados. Cortes histológicos se observaron con un microscopio de fluorescencia, distinguiendo la zona de los haces vasculares y el parénquima buscando posibles diferencias en la intensidad de señal de los distintos anticuerpos usados: LM 5 (galactanos unidos a RG-1) y LM 6 (arabinanos unidos a RG-1) (Figura 3.12); LM 19 (HG parcialmente metilado y con bajo grado de esterificación) y LM 26 (galactosa de las ramificaciones de RG-1) (Figura 3.13); JIM 5 (HG parcialmente metilado con bajo grado de esterificación) y JIM 7 (HG parcialmente metilado con alto grado de esterificación) (Figura 3.14); e INRA-RU1 (esqueleto del RG-1) (Figura 3.15).

En cuanto a la morfología de las células, no se ven grandes cambios en los cortes de las líneas transgénicas con respecto a los de la línea control, ni en la zona de los

haces vasculares ni en la zona del parénquima. En todas las muestras se observó un aumento de tamaño celular, una reducción en la densidad de células y un aumento del espacio intercelular conforme la visualización se alejaba de los haces vasculares. En los cortes de todas las líneas se observó una estructura bien organizada.

Aparentemente, la señal en los haces vasculares, con todos los anticuerpos utilizados, es intensa y sin grandes cambios entre las secciones de las diferentes líneas analizadas. En las células del parénquima si se observaron algunas diferencias de señal. Frutos de ambas líneas transgénicas mostraron entre ellos una señal similar en la mayoría de componentes analizados. Los frutos transgénicos mostraron una alta señal del anticuerpo LM 5 (galactanos unidos a RG-1), JIM 7 (HG con alto grado de esterificación) e INRA-RU1 (esqueleto de RG-1) y una baja señal con el anticuerpo LM 19 (HG con bajo grado de esterificación), LM 26 (galactosa de ramificaciones de RG-1) y JIM 5 (HG con bajo grado de esterificación). Donde sí hubo más diferencia de señal entre los frutos de ambas líneas transgénicas fue en la detección de arabinanos en las cadenas laterales de RG-1 mediante el anticuerpo LM 6, donde la muestra de la línea FaRG 26 mostró una señal débil y la muestra de la línea FaRG 87 apenas mostró señal. Los cortes de frutos control mostraron señales similares a las comentadas en las muestras transgénicas con los anticuerpos LM 19, LM 26 y JIM 7. Diferiendo de la señal mostrada por la muestra de la línea FaRG 26 y asemejándose a la mostrada por la muestra de la línea FaRG 87, la señal con el anticuerpo LM 6 en los cortes control fue prácticamente inexistente. La señal mostrada por la muestra control con los anticuerpos LM 5, JIM 5 e INRA-RU1 fue menor que en la mostrada por las muestras transgénicas de ambas líneas, siendo esta diferencia mucho más evidente en la cantidad de esqueleto de RG-1 (detectado por INRA-RU1).

Este estudio visual se reforzó con la cuantificación de fluorescencia emitida por píxel de cada imagen. Los resultados obtenidos con las imágenes de la zona de los haces vasculares concuerdan con lo comentado anteriormente, pues no se cuantificaron diferencias significativas entre muestras con ningún anticuerpo (Figura 3.16). Además, por regla general, la fluorescencia/píxel fue mayor en las zonas de los haces vasculares que en el parénquima, siendo el anticuerpo LM 5 la única excepción. La relación fluorescencia/píxel en el parénquima confirmó que la diferencia más importante mostrada al comparar la señal de las muestras transgénicas de ambas líneas con la de la muestra control se dio con el anticuerpo específico del esqueleto de RG-1 (INRA-RU1), siendo el aumento de señal en ambas muestras transgénicas significativo. La mayor señal comentada en los cortes de la línea FaRG 26 con el anticuerpo LM 6, fue confirmada con esta relación fluorescencia/píxel, siendo el aumento significativo con respecto a las muestras de las otras líneas. Las señales del resto de anticuerpos no mostraron diferencias significativas entre líneas (Figura 3.17).

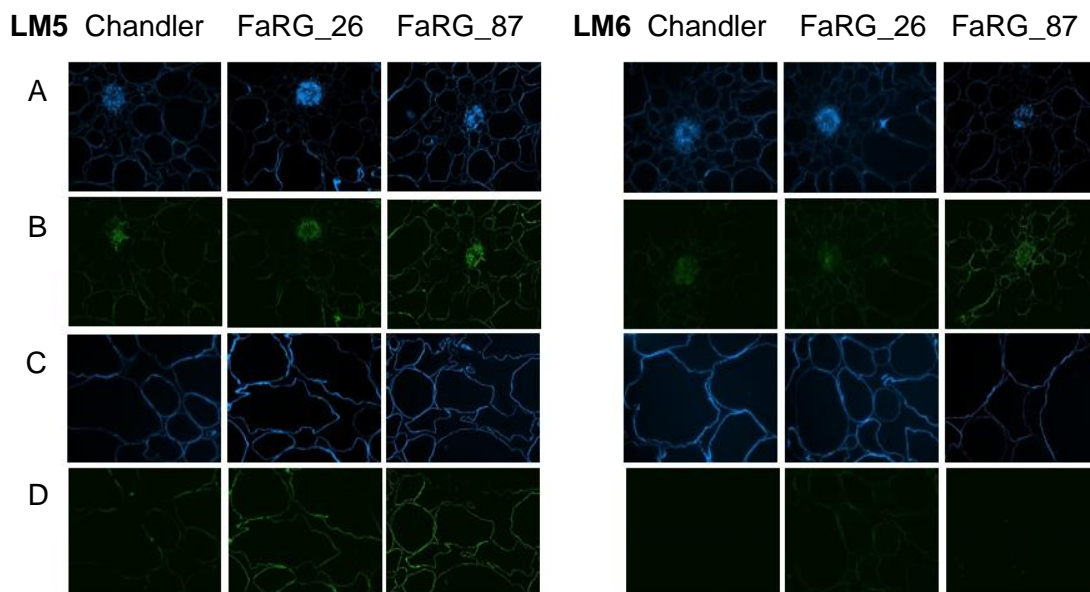


Figura 3.12: Imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia, de un ensayo inmunoenzimático realizado en secciones histológicas de frutos en estadio rojo de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control, realizado con los anticuerpos monoclonales LM 5 (galactanos unidos al esqueleto de RG-1) y LM 6 (arabinanos unidos a RG-1). En las filas A y C se visualiza la señal emitida por una tinción con calcoflúor (sirve como testigo) y en las filas B y D la señal propia de los anticuerpos estudiados. Las filas A y B corresponden a la zona de los haces vasculares (células vasculares y células del parénquima colindantes) y las filas C y D a la zona del parénquima más distal de los haces vasculares (células del parénquima).

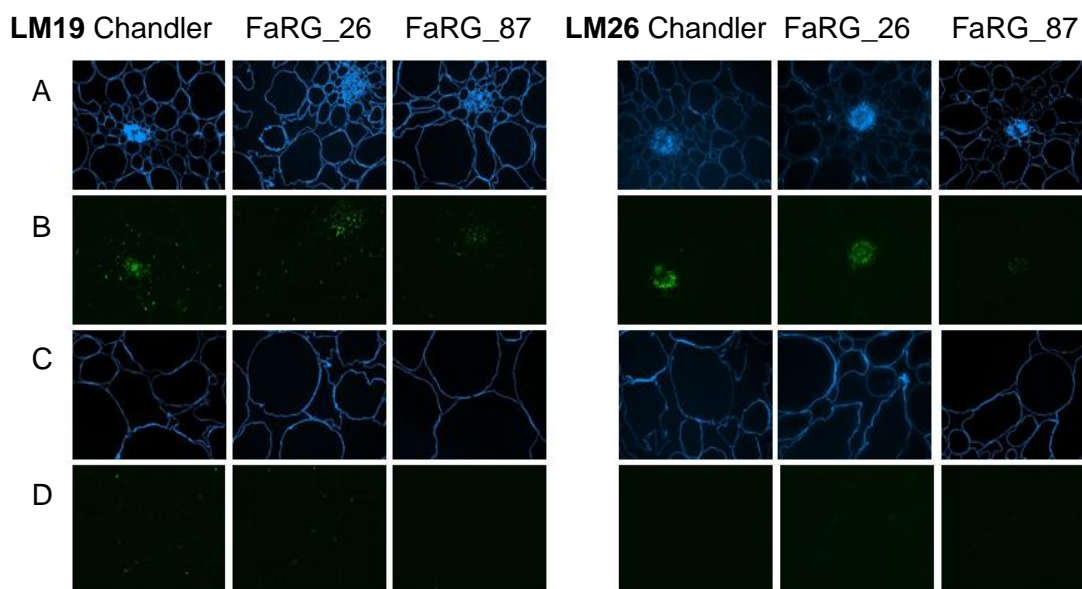


Figura 3.13: Imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia, de un ensayo inmunoenzimático realizado en secciones histológicas de frutos en estadio rojo de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control, realizado con los anticuerpos monoclonales LM 19 (HG parcialmente metilado con bajo grado de esterificación) y LM 26 (galactosa de las

ramificaciones de RG-1). En las filas A y C se visualiza la señal emitida por una tinción con calcoflúor (sirve como testigo) y en las filas B y D la señal propia de los anticuerpos estudiados. Las filas A y B corresponden a la zona de los haces vasculares (células vasculares y células del parénquima colindantes) y las filas C y D a la zona del parénquima más distal de los haces vasculares (células del parénquima).

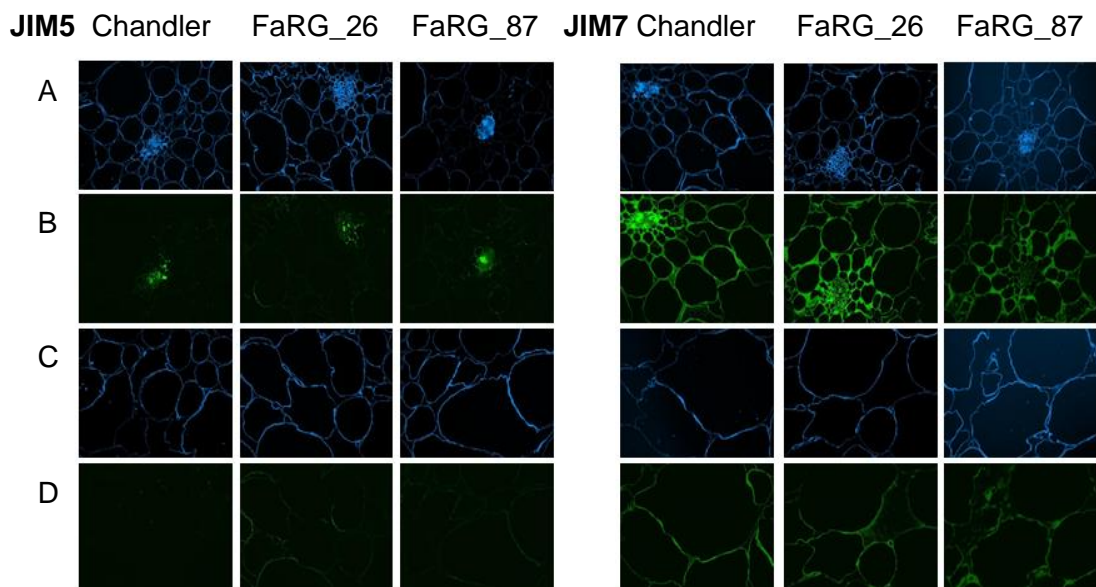


Figura 3.14: Imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia, de un ensayo inmunoenzimático realizado en secciones histológicas de frutos en estadio rojo de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control, realizado con los anticuerpos monoclonales JIM 5 (HG parcialmente metilado y con bajo grado de esterificación) y JIM 7 (HG parcialmente metilado con alto grado de esterificación). En las filas A y C se visualiza la señal emitida por una tinción con calcoflúor (sirve como testigo) y en las filas B y D la señal propia de los anticuerpos estudiados. Las filas A y B corresponden a la zona de los haces vasculares (células vasculares y células del parénquima colindantes) y las filas C y D a la zona del parénquima más distal de los haces vasculares (células del parénquima).

RU1 Chandler FaRG\_26 FaRG\_87

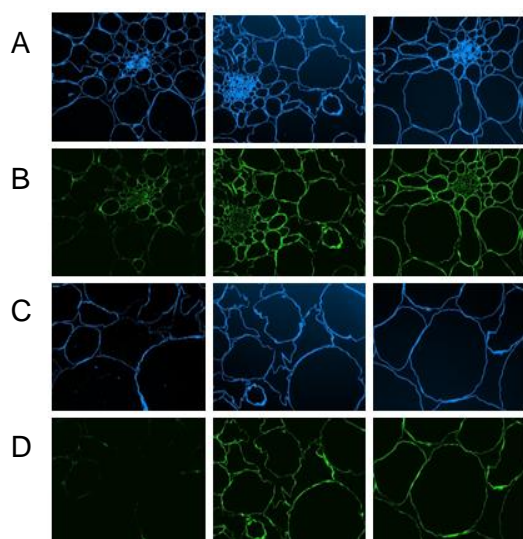


Figura 3.15: Imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia, de un ensayo inmunoenzimático realizado en secciones histológicas de frutos en estadio rojo de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control, realizado con el anticuerpo monoclonal INRA-RU1 (esqueleto de RG-1). En las filas A y C se visualiza la señal emitida por una tinción con calcofluór (sirve como testigo) y en las filas B y D la señal propia de los anticuerpos estudiados. Las filas A y B corresponden a la zona de los haces vasculares (células vasculares y células del parénquima colindantes) y las filas C y D a la zona del parénquima más distal de los haces vasculares (células del parénquima).

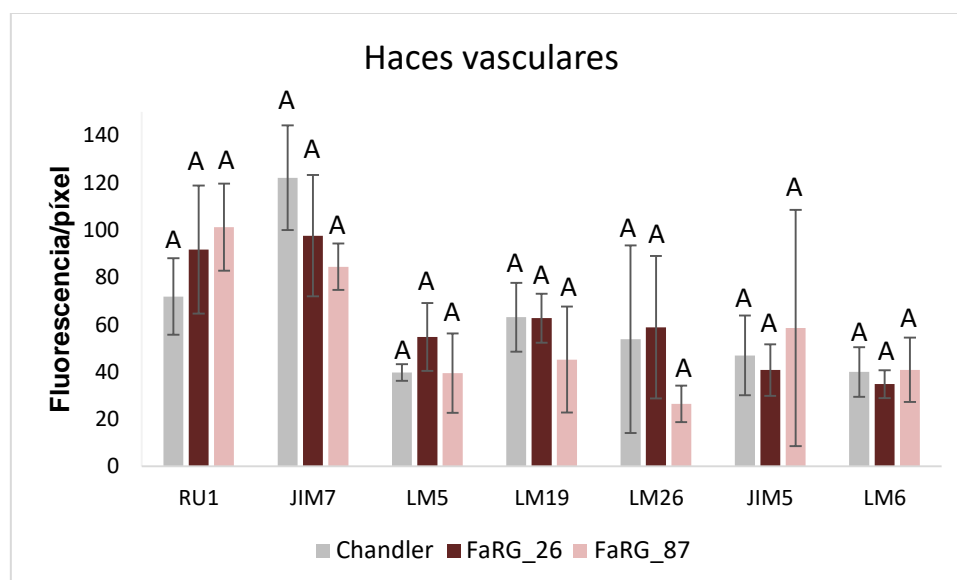


Figura 3.16: Relaciones fluorescencia (unidades arbitrarias en la escala 0-255 de grises del canal verde)/píxel obtenidas en las imágenes realizadas por microscopía de fluorescencia en la zona de los haces vasculares de cortes histológicos de frutos en estadio maduro (n = 3) de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control con los anticuerpos monoclonales INRA-RU1, JIM 7, LM 5, LM 19, LM 26, JIM 5 y LM 6. Para cada anticuerpo, los datos con la misma letra no mostraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

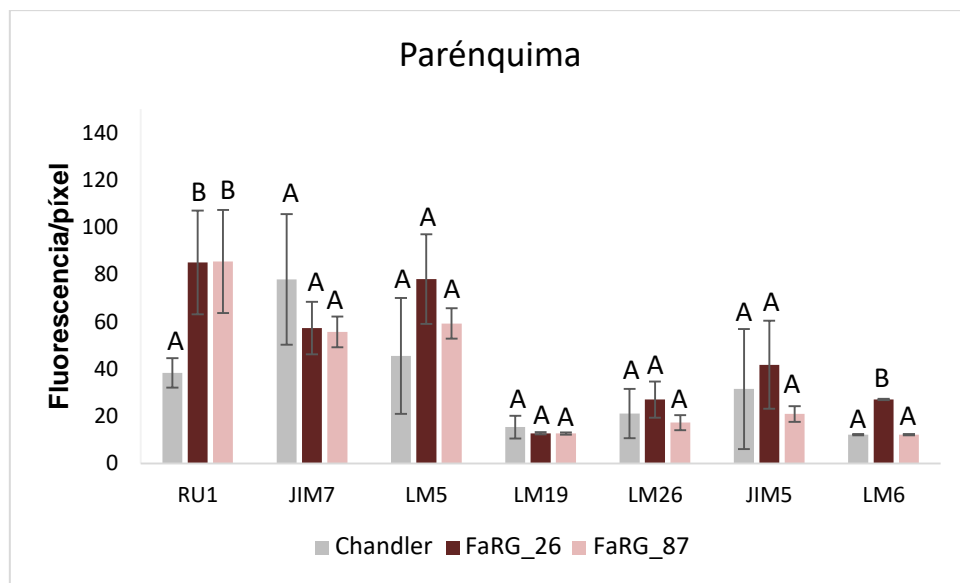


Figura 3.17: Relaciones fluorescencia (unidades arbitrarias en la escala 0-255 de grises en el canal verde)/píxel obtenidas en las imágenes realizadas por microscopía de fluorescencia en la zona del parénquima distal de los haces vasculares de cortes histológicos de frutos maduros (n = 3) de las líneas FaRG 26, FaRG 87 y control con los anticuerpos monoclonales INRA-RU1, JIM 7, LM 5, LM 19, LM 26, JIM 5 y LM 6. Para cada anticuerpo, los datos con la misma letra no mostraron diferencias significativas según una prueba HSD Tukey ( $p < 0,05$ ).

### III.4 Discusión

Durante la maduración del receptáculo de fresa, uno de los procesos más importantes son el cambio de textura, produciéndose un reblandecimiento (Paniagua et al., 2014). En general está aceptado que las principales causas de este reblandecimiento se deben a una disolución en la lámina media y, por consiguiente, a una disminución de las zonas de adhesión (Brummell, 2006; Mercado et al., 2011). Las pectinas son muy abundantes en la lámina media y parece que juegan un papel importante en la adhesión celular, ya que pueden conectarse entre sí y con XG y celulosa de la pared celular primaria (Foster et al., 1996; Thompson y Fry, 2000; Willats et al., 2001; Broxterman y Schols, 2018b).

El RG-1 es uno de los 3 componentes de las pectinas siendo, tras el HG, el componente mayoritario (Yapo, 2011; Posé et al., 2019). Hay estudios que sugieren la importancia del RG-1 en el desensamblaje de las pectinas durante la maduración, y por ende, en la adhesión celular (Molina-Hidalgo et al., 2013; Méndez-Yañez et al., 2020). En este trabajo se han analizado los frutos de 2 líneas transgénicas independientes de *F. x ananassa* con el gen *FaRGlyase 1* silenciado, comparándolos con frutos control no transgénicos. Los análisis de firmeza realizados en estos frutos apoyan esta idea, ya que los frutos de ambas líneas mostraron una firmeza significativamente superior a los frutos control. En los trabajos de Molina-Hidalgo et al. (2013) mediante transformación transitoria por agroinfiltración en *F. x ananassa*, y Ochoa-Jiménez et al. (2018) en tomate, obtuvieron resultados similares incrementándose la firmeza de los frutos al silenciar esta enzima.

El resto de variables analizadas no siguieron la misma tendencia en ambas líneas, ya que, mientras que los frutos de la línea FaRG 26 pesaron menos y eran más cortos que los frutos control, los de la línea FaRG 87 no mostraron diferencias significativas. El mismo comportamiento se observó en el color de los frutos, ya que solo la línea FaRG 26 mostró un cambio significativo en la variable L (luminosidad), produciendo frutos con más brillo. Sin embargo, los frutos de la línea FaRG 87, por su parte, presentaron una menor cantidad de sólidos solubles que los frutos control, diferencia no observada en frutos de la línea FaRG 26. A pesar de estas diferencias comentadas, los frutos de ambas líneas sí tuvieron un tiempo de desarrollo y maduración similar a los frutos control, mostrando en todos los casos una pigmentación homogénea.

El hecho de que tan solo la firmeza fuera la variable en el que frutos de ambas líneas mostraron diferencias significativas, lleva a pensar que ha sido el único carácter afectado por el silenciamiento mediante ARNi, y que el resto de cambios fueron producidos aleatoriamente como consecuencia de la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria introduce parte de su ADN (t-ADN) en lugares aleatorios del genoma de la planta huésped por escisión y ligación (Bartlett et al., 2014), pudiendo alterar genes diferentes en eventos de transformación independientes. Además, se ha documentado ampliamente que la transformación mediante este patógeno puede provocar mutaciones en la zona de inserción, como resultado de escisiones (Kumar y Fladung, 2002; Kim et al., 2003), reordenamientos por duplicaciones y translocaciones (Nacry et al., 1998; Tax y Vernon, 2001), y/o inserción de copias enteras o parciales del transgen (Chen et al., 2003; Latham et al., 2006), o en zonas no cercanas a la inserción del t-ADN, principalmente al regenerarse

tejido vegetal en medios de cultivo y/o por la infección de *Agrobacterium* (Labra et al., 2001).

Esta hipótesis se ve respaldada por los datos procedentes de la secuenciación de ARN de estos frutos. Frutos de la línea FaRG 26 mostraron un silenciamiento significativo de 20 genes, mientras que en los frutos de la línea FaRG 87 solo se silenciaron 8 genes. De estos genes silenciados, sólo 2 se vieron silenciados en los frutos de ambas líneas transgénicas, siendo ambos genes codificantes de probables ramnogalacturonano liasa y, por homología, muy parecidas a la caracterizada ramnogalacturonano endoliasa de la familia RGL4 en *F. chiloensis* en el trabajo de Méndez-Yañez et al. (2020). Además, en los frutos de la línea FaRG 26 se vieron sobreexpresados 94 genes, frente a 4 de la línea FaRG 87, estando tan sólo 2 sobreexpresados en ambas líneas. Estos dos genes son de función desconocida en fresa. Por similitud, una de las proteínas codificadas no está caracterizada y otra es de función desconocida con un dominio de unión al ADN tipo MYB, por lo que no se puede inferir que no estén implicados en el incremento de firmeza.

En cuanto a la variación en el brillo del color de los frutos de la línea FaRG 26, una hipótesis es que se debe a un cambio en la composición de la cera del fruto. Esta hipótesis se basa en que uno de los genes silenciados es una 3-cetoacyl-CoA sintasa, cuya función es necesaria para obtener cadenas largas de ácidos grasos en cera de hojas y frutos (Millar et al., 1999; Vogg et al., 2004). Está documentado que la alteración en la composición de la cera afecta al brillo del fruto (Ward y Nussinovitch, 1996), por lo que podría apoyar esta hipótesis. Otra posibilidad, aunque menos plausible, es que se debe a la sobreexpresión de dos enzimas aldehídos deshidrogenasas. Enzimas de esta familia han sido relacionadas con la defensa frente a patógenos (Jimenez-Lopez et al., 2016) y con la participación en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Estrada et al., 2008), pudiendo cambiar con su acción el color del fruto. Sin embargo, esta hipótesis es menos probable, ya que los cambios observados en los frutos de la línea FaRG 26 no están relacionados con la tonalidad o el matiz del color, sino con el brillo.

El cambio en el tamaño de los frutos de la línea FaRG 26 podría deberse a la alteración en la pared celular sufrida por parte del silenciamiento de *FaEGlyase 1*, sin embargo, los frutos de la línea FaRG 87 no mostraron diferencias significativas, lo que lleva a pensar que puede haber otro gen involucrado. Los frutos de la línea FaRG 26 tienen un factor de despolimerización de la actina sobreexpresado. Estos factores se unen a filamentos de actina y los cortan, reorganizando el citoesqueleto y controlando la expansión celular (Maciver, 1998). La acción de los factores de despolimerización de actina ha sido descrita en diferentes procesos de tejidos muy variados, como el cierre de los estomas (Dong et al., 2001), formación de tubos polínicos (Allwood et al., 2002) o en la elongación de pelos radiculares (Jiang et al., 1997). Hai-Yun Wang et al. (2009) reprimieron un factor de despolimerización de actina en algodón y consiguieron fibras más largas como consecuencia de filamentos de actina más abundantes. En tomate se ha realizado un análisis transcriptómico cuyos resultados sugieren que el tamaño del fruto puede estar controlado por la expresión de estos factores de despolimerización de la actina, controlando la expansión celular e induciendo la señalización por auxina (Khatun et al., 2016). Esto, junto con los resultados obtenidos en *Arabidopsis* por Dong et al. (2001), donde el silenciamiento de uno de estos

factores estimuló la expansión celular y el crecimiento de órganos, mientras que la sobreexpresión provocó una disminución de fibrillas de actina seguido de menor expansión celular y menor crecimiento de órganos, lleva a pensar que en los frutos de la línea FaRG 26, la sobreexpresión de este factor de despolimerización de actina pudo provocar el mismo efecto y, en consecuencia, un menor tamaño de fruto. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el aumento de volumen del fruto se debe a una combinación de la división celular y de la expansión celular, siendo este segundo proceso más decisivo tras los 7 primeros días de la formación del fruto (Sharma et al., 2019).

Por otro lado, aparentemente no hay ningún gen afectado que pudiera explicar la menor cantidad de sólidos solubles observada en los frutos de la línea FaRG 87. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de pared celular, donde las líneas transgénicas muestran más cantidad de pectinas unidas covalentemente a la pared primaria (resultados serán discutidos más adelante), una posibilidad sería relacionar esta composición de pared celular (principalmente pectinas) de los frutos transgénicos con la menor cantidad de sólidos solubles. Ahora bien, los frutos de la línea FaRG 26 mostraron cambios parecidos en la pared celular y en la firmeza, pero no así en la cantidad de sólidos solubles, hecho que podría deberse a que esta línea mostró una sobreexpresión de un 422 % de un gen codificante de la "sugar transport protein 13", proteína que ha sido relacionada con el aumento de azúcar y, por tanto de sólidos solubles, durante la maduración del melocotón (Zhang et al., 2019). Esta sobreexpresión, podría estar compensando la reducción de sólidos solubles como consecuencia del silenciamiento de *FaRGlyase 1* en frutos de la línea FaRG 26.

Estos resultados son diferentes a los obtenidos tras el silenciamiento del gen *FaPG<sub>1</sub>* codificante de la enzima poligalacturonasa, donde se produjeron frutos con más firmeza que los controles pero sin afectar a otros parámetros como la cantidad de sólidos solubles (Quesada et al., 2009). A pesar de que es conocido el papel de las invertasas para romper moléculas de sacarosa liberando moléculas de D-glucosa y D-fructosa (Yahia y Carrillo-Lopez, 2018), principales monosacáridos presentes en frutos maduros (Mahmood et al., 2012), hay estudios en papaya y en uva que correlacionan el aumento de sólidos solubles durante la maduración del fruto con la pérdida de masa de pared celular (Manrique y Lajolo, 2004; Nunan et al., 1998), abriendo la posibilidad de que el aumento de sólidos solubles pueda estar relacionado con la despolimerización de la pared celular. En el trabajo de Carpita y Gibeaut, (1993) propusieron que durante la elongación celular los fragmentos de celulosa tras la despolimerización pudieran ser reciclados. Los resultados de este trabajo podrían indicar que la mayor cantidad de componentes pectínicos en las fracciones unidas covalentemente a la pared celular, como consecuencia de una menor solubilización y/o despolimerización de las paredes celulares, podrían no estar reutilizándose como fuente de hexosas, favoreciendo la reducción de sólidos solubles. Este proceso estaría enmascarado en la línea FaRG 26 por la sobreexpresión de una proteína transportadora de azúcar relacionada con la maduración de fruto.

Los datos obtenidos en la cuantificación de polisacáridos en las fracciones apoyan esta interpretación. Ambas líneas transgénicas muestran un mayor rendimiento que la línea control, lo que coincide con estudios anteriores en frutos transgénicos con genes

de pectinasas silenciados (Paniagua et al., 2016; Posé et al., 2013; Quesada et al., 2009; Santiago-Doménech et al., 2008) donde, en líneas generales, estas fracciones también mostraron mayores rendimientos. Además, en estos trabajos tampoco mostraron diferencias notables en los pesos de fracciones extraídas con KOH 1 M y 4 M.

Donde sí muestra este trabajo resultados diferentes a los anteriores es en el peso de la fracción soluble extraída con PAW, ya que los frutos de las líneas transgénicas mostraron un aumento en el rendimiento de esta fracción con respecto a los frutos control. Está documentado que conforme avanza la maduración del fruto, la fracción de pectinas solubles aumenta, mientras que la fracción de pectinas retenidas disminuye (Koh y Melton, 2002; Paniagua et al., 2017; Posé et al., 2019). Sin embargo, estas líneas transgénicas produjeron frutos con más cantidad de polisacáridos solubles y polisacáridos retenidos, sin aumentar de forma significativa la diferencia de peso de pared celular sin fraccionar. Esto se vio respaldado por la cantidad de ácido galacturónico en las fracciones solubles y unidas por enlaces iónicos, al contrario de lo observado en la cantidad de glucosa, donde no se observaron diferencias significativas en ninguna de las fracciones.

Para complementar el estudio realizado de pared celular se hizo un estudio de inmunofluorescencia en tejido que permitió determinar que la fluorescencia en las células cercanas a los haces vasculares fue similar con todos los anticuerpos usados en las 3 líneas analizadas. Esto corrobora lo descrito en la bibliografía en relación a que los cambios importantes en la pared celular causantes del reblandecimiento del fruto se producen en las células del parénquima (Paniagua et al., 2017; Posé et al., 2019).

En las células del parénquima, el anticuerpo específico de la cadena principal de RG-1 fue el único que mostró una señal significativamente más alta en los frutos de ambas líneas transgénicas que en los frutos control. La señal mostrada se localizaba en las paredes celulares primarias, y no en los espacios intercelulares. Otro anticuerpo que mostró una mayor señal, en la línea FaRG 26 con respecto a los frutos de las otras dos líneas, fue el específico de cadenas laterales de arabaninanos, siendo la diferencia menos acusada que la mostrada en el esqueleto de RG-1. Estos datos no se pueden comparar a los obtenidos en el microarray, ya que son técnicas complementarias, no excluyentes. En tejido la disponibilidad de sustrato es diferente, así como la sensibilidad de ambas técnicas. No obstante, lo que nos confirman estos resultados es que el silenciamiento del gen *FaRGlyase 1*, con la reducción de expresión correspondiente de dos ramnogalacturonano endoliasas, tuvo un efecto importante en el mantenimiento de la integridad del esqueleto de RG-1, aumentando la disponibilidad de su epítipo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el microarray, en la fracción soluble de polisacáridos de los frutos de las líneas transgénicas muestran una mayor cantidad de componentes relacionados con RG-1 (esqueleto y ramificaciones) y una mayor cantidad de HG altamente metilesterificado (como se observa por la mayor señal del anticuerpo JIM 7). Lo interesante de los resultados mostrados en esta fracción es que la línea control mostró una mayor cantidad de HG con bajo grado de esterificación (JIM 5 y LM 18) (Clausen et al., 2003; Verhertbruggen et al., 2009). El HG es

sintetizado en el aparato de Golgi con un alto grado de metilesterificación en los residuos C6, exportándose y depositándose en la pared celular con un grado de entre 70 % y 80 % de metilesterificación (Willats et al., 2001). Conforme avanza el desarrollo del tejido, este grado de esterificación disminuye gracias a la acción de la PME, la cual actúa primero hidrolizando el enlace éster del grupo C6 y luego transfiriendo el grupo metilo a otra molécula (Moya-León et al., 2019). Este grado de esterificación parece importante en la estructura de la pared celular, ya que la desesterificación provoca que los HG queden cargados negativamente y puedan establecer uniones a través de cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Goldberg et al., 1996; Draye y Van Cutsem, 2008). Además, al desesterificar las cadenas de HG, permite la acción de otras enzimas que despolimerizan la pared celular como la pectato liasa (PL) y la poligalacturonasa (PG), ya que estas enzimas actúan sobre sustratos con un bajo grado de metilación (Draye y Van Cutsem, 2008).

En resumen, el bloqueo de las enzimas ramnogalacturonano liasa provocó un aumento en la proporción de HG con alto grado de metilación en la fracción soluble localizada en la lámina media, acompañado de un aumento en el resto de componentes relacionados con el RG-1. Este alto grado de metilación se puede deber a una menor actividad de la PME, pudiendo repercutir en la acción de otras enzimas despolimerizantes como PL y PG, favoreciendo el aumento del resto de componentes de la pared celular tanto en la fracción soluble como en la retenida en la pared celular primaria y, en conjunto, incrementando la firmeza del fruto.

Uno de los factores que regulan la acción de la PME es el pH. Se ha comprobado que existen diferentes isoformas de esta enzima que pueden actuar a diferentes pH cambiando su forma de actuación, siendo en fruto la isoforma predominante activa a pH alcalino (en torno a 7,5) (Draye y Van Cutsem, 2008; Ünal y Şener, 2015). La PME va desmetilando el HG conforme avanza la maduración, rompiendo enlaces de tipo éster y liberando grupos metilo ácidos, acidificando el medio. Esta acidificación podría ser una de las responsables de que la acción de la PME disminuya en etapas muy avanzadas de la maduración (Moustacas et al., 1991). Teniendo en cuenta lo importante que es el pH para la acción de esta enzima, una hipótesis de los resultados obtenidos sería que, el silenciamiento de las dos ramnogalacturonano liasas en el fruto, provocó una menor despolimerización del esqueleto RG-1 y que, debido a su composición rica en ácido galacturónico, afectó al pH. Este cambio de pH conllevó una disminución de la acción de la PME lo que, a su vez, provocó una menor proporción de HG desmetilado frente al esterificado y, por tanto, menor sustrato disponible para la acción de otras enzimas como la PL y la PG. Esta disminución de la actividad, por falta de sustrato, tendría como consecuencia una menor solubilización y despolimerización de la mayoría de los componentes de la pared celular. Este proceso estaría desencadenado en la lámina media, ya que la fracción soluble ( $\text{H}_2\text{O}$ ) es enriquecida en pectinas situadas la lámina media (Redgwell et al., 1992) pero que, a la larga repercutiría en la fracción de pectinas ancladas fuertemente a la pared celular primaria (Figura 3.18). Esta hipótesis, de que una de las principales funciones de las pectinas es la regulación de la despolimerización de la pared celular mediante el pH, ya se ha propuesto anteriormente (Moustacas et al., 1986; Nari et al., 1986), citando a una posible relación entre la PME y las xiloglucanasas. Los resultados obtenidos en este trabajo exponen una posible función de la ramnogalacturonano liasa que potencia la

acción de la PME, fundamental para la acción de otras enzimas como la PL y la PG. Esta idea también se ve reforzada por el reciente trabajo publicado de Xue et al. (2020), donde se caracterizaron dos PME que se expresaban en fruto de *F. vesca* obteniendo con el silenciamiento resultados similares, en cuanto a firmeza se refiere, que los obtenidos en este trabajo. Además, mediante un estudio transcriptómico, comprobaron que con el silenciando de estas enzimas se reprimían varios genes relacionados con la despolimerización de la pared celular (como la PG, PL, celulasa o xiloglucanasa) y con el aumento de sólidos solubles (relacionados con síntesis y transporte de azúcares), indicando la relación de las PME con ambos procesos, reforzando a su vez la hipótesis anteriormente descrita en esta discusión de que el silenciamiento de ambas ramnogalacturonano liasas podría provocar una reducción en la cantidad de sólidos solubles tal como reflejan los frutos de la línea FaRG 87, siendo dicho efecto amortiguado en los frutos de la línea FaRG 26.

Los resultados del microarray de anticuerpos de pared celular muestran que los frutos control tendrían más cantidad de glucuronoxilano que los frutos de las líneas transgénicas. Este compuesto solo muestra valores en pared celular primaria, representada por las fracciones KOH 4 M y cadoxeno, debido a que se trata de una hemicelulosa. El xiloglucano, el polisacárido hemicelulósico más abundante en la pared celular de los frutos, está formado por una cadena de glucosa similar a la celulosa, pero conteniendo ramificaciones conectadas por un grupo de xilosa (O'Neill y York, 2013). Sin embargo, los xilanos son otra clase de hemicelulosa con una representación importante dentro de la pared celular. Los xilanos tienen una cadena principal de residuos de xilosa, que pueden ser sustituidos por ácido glucurónico, ácido 4-O-metilglucurónico, arabinosa o acetilo. En los frutos, los xilanos más abundantes son los glucuronoxilanos (Assor et al., 2013).

Dentro de las hemicelulosas el componente más estudiado es el XG, ya que es el más abundante y puede formar fuertes interacciones con la celulosa a través de puentes de hidrógeno (Park y Cosgrove, 2012). Los XG han sido propuestos como puntos de soporte de la tensión de la pared celular, anclándose a las microfibrillas de celulosa, quedando las pectinas relegadas a un dominio independiente que podría influir en la estructura (Carpita y Gibeaut, 1993). Sin embargo, estudios posteriores demostraron la capacidad de las pectinas de formar uniones con las microfibrillas de celulosa, con la misma afinidad que los XG, dando un mayor peso a las pectinas en la estructura de la pared celular (Dick-Pérez et al., 2011; Wang et al., 2018, 2012; Tuo Wang et al., 2015; Zykwincka et al., 2005). También se encontraron en tomate uniones entre RG-1 y XG (Cornuault et al., 2018), dando mucha importancia en los diferentes modelos de pared celular a los XG. Sin embargo, en el reciente trabajo realizado por Broxterman y Schols, (2018a), demostraron que la unión de las pectinas a las hemicelulosas se debía a enlaces covalentes entre los esqueletos de RG-1 y de los glucuronoxilanos. Esto fue comprobado en fruto de tomate, pero los autores tras un estudio en fresa, detectaron altas cantidades de glucuronoxilanos, por lo que dejan abierta la posibilidad de que ocurra lo mismo. Los resultados de este trabajo muestran que bloqueando la despolimerización del RG-1 la cantidad de XG apenas se ve alterada, pero la cantidad de glucuronoxilanos sí que se ve reducida significativamente. En este contexto, la reducción en la señal de glucuronoxilanos, al haber más cantidad de RG-1, se puede deber a una menor disponibilidad de epítipo, es decir, en la línea control al haber más

despolimerización del RG-1, el glucuronoxilano quedaría más expuesto a la unión con anticuerpos. La unión de RG-1 con glucuronoxilanos podría dificultar el acceso de anticuerpos a su unión, obteniéndose una señal menor. Esto sugiere una posible conexión entre RG-1 y los glucuronoxilanos, cambiando la percepción que se tenía de la unión entre las hemicelulosas y las pectinas. El RG-1 podría jugar un papel crucial en la integridad de la lámina media como nexo de unión entre pectinas y el dominio celulosa-hemicelulosa de la pared celular primaria. La pérdida de este nexo sería clave en el reblandecimiento del fruto durante la maduración.

Hay evidencias de que las cadenas laterales neutras del RG-1 están en mayor cantidad en la pared celular primaria, y que las cadenas ricas en ácido galacturónico del esqueleto se encuentran principalmente en la lámina media (Posé et al., 2012; Vincken et al., 2003). Nuestros resultados evidencian, en los frutos control, que todos los epítomos de los componentes del RG-1, tanto del esqueleto como ramificaciones, dieron señal únicamente en la fracción KOH 4 M, fracción que representa los componentes presentes en la pared celular primaria. Sin embargo, al silenciar *FaRGlyase 1*, todos estos componentes dieron señales en todas las fracciones, incluida la soluble, aunque la señal fue más alta en las fracciones unidas a la pared celular primaria. Esto nos lleva a pensar que probablemente en estadios inmaduros del fruto haya presencia de RG-1 (cadenas laterales y esqueleto) en la lámina media y en la pared celular primaria, siendo superior en la pared celular primaria pero que al progresar la maduración hay también una diferencia en la despolimerización de estos componentes, siendo superior en la lámina media. Esto hace que en frutos no transgénicos, en estadio maduro, solo quede la señal de componentes retenidos en la pared primaria, poniendo en evidencia el alto dinamismo de RG-1 durante la maduración. Dicha interpretación está en consonancia con los resultados obtenidos en los trabajos de Molina-Hidalgo et al. (2013) y Ochoa-Jiménez et al. (2018), donde se concluyó la importancia de RG-1 en el mantenimiento de la integridad de la lámina media y, por tanto, en la importancia en la adhesión celular y en la vida poscosecha de los frutos de fresa y tomate respectivamente. Se observa también una mayor cantidad de proteínas arabinogalactano en todas las fracciones de las líneas transgénicas y una mayor cantidad de HG en las fracciones unidas a la pared celular primaria.

Todos estos resultados indican que la represión de las ramanogalacturonano liasas inducen una serie de cambios en la acción de otras enzimas (este trabajo discute que podría ser la PME en primera instancia). Estos cambios conllevarían la alteración de prácticamente todos los componentes de la pared celular estudiados en este trabajo. Wang et al. (2018) ya propusieron que el reblandecimiento de los frutos no se debe a la acción de una enzima concreta, sino a la acción de una compleja red interconectada y sincronizada de múltiples enzimas. Los resultados obtenidos permiten proponer a RG-1 como candidato a ser uno de los primeros componentes de la pared celular en ser despolimerizado en esta red de acción enzimática. Resultados previos parecían indicar que la degradación de las cadenas laterales del RG-1 era necesaria para el acceso de la ramanogalacturonano liasa al esqueleto y, por tanto, para su acción. Sin embargo, al reprimir 2 ramanogalacturonano liasas se observa un aumento importante en la cantidad de cadenas laterales neutras, sugiriendo que la despolimerización de la cadena principal RG-1 favorece la acción de  $\beta$ -galactosidasas y arabinofuranosidasas. Otra opción, podría ser que se requiera de la acción alternante de estas enzimas, es

decir, no actuaría una familia de enzimas primero y luego otra, si no que actuaría una, que al despolimerizar su sustrato daría acceso a otra enzima, la cual al despolimerizar podría dar acceso a la primera enzima de nuevo dejando disponible sustrato, y así sucesivamente. Por tanto, la acción de dichas enzimas dependería de la disponibilidad de sustrato, siendo esta condicionada por la acción de la enzima anterior (Figura 3.18).

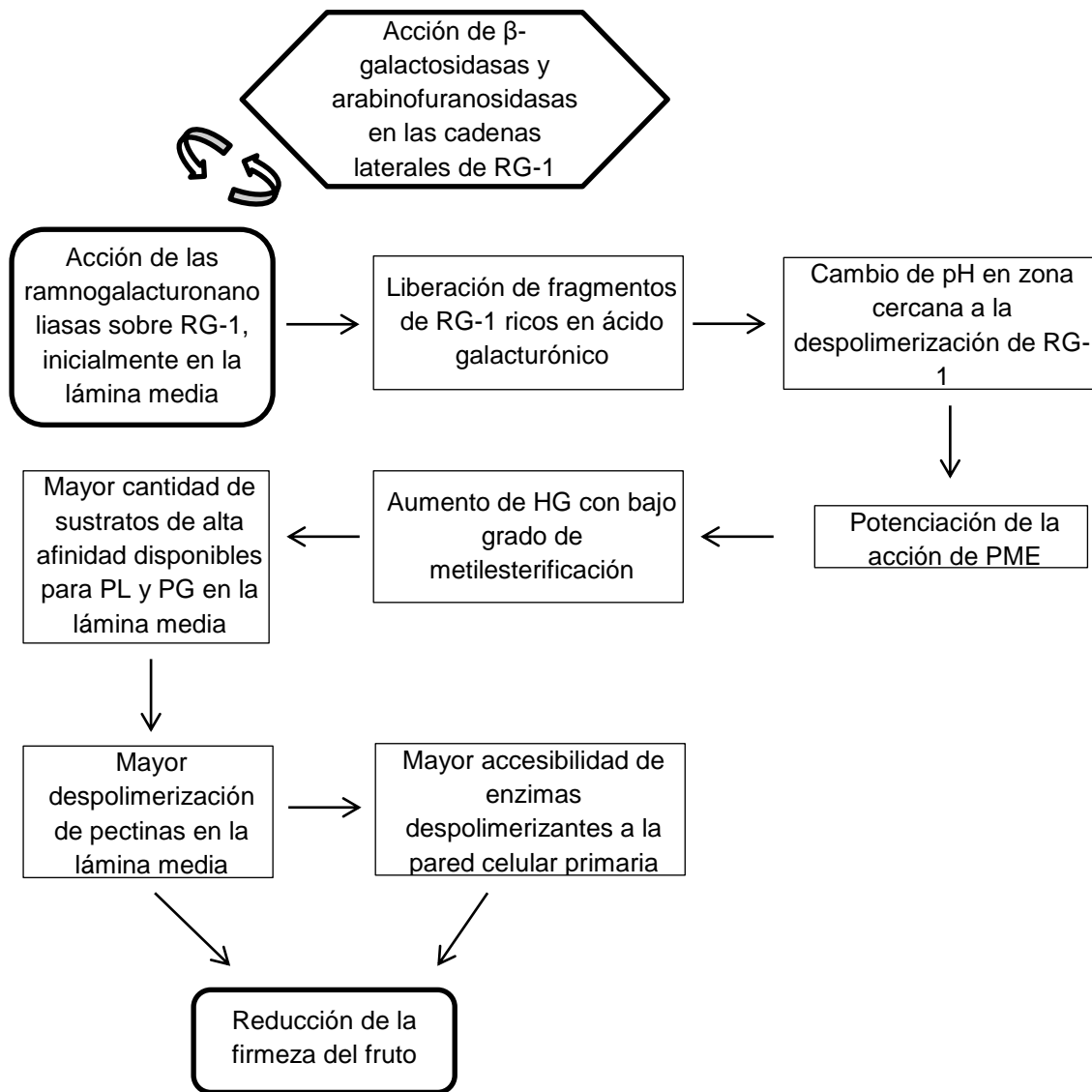


Figura 3.18: Diagrama de flujo que describe la posible cadena de sucesos que ocurren en la despolimerización de la pared celular durante la maduración del fruto.

# **Capítulo IV: Explorando el uso del cultivo de callos procedentes de receptáculo como sistema modelo para estudiar la acumulación de pigmentos y la remodelación de la pared celular durante la maduración de la fresa**



## **Capítulo IV: Explorando el uso de cultivos de callos procedentes de receptáculo como sistema modelo para estudiar la acumulación de pigmentos y la remodelación de la pared celular durante la maduración de la fresa**

### **IV.1 Introducción**

La maduración de los frutos carnosos es un proceso complejo que implica cambios en el color, sabor y textura, que hacen posible que sean atractivos para los animales, encargados de dispersar semillas (Giovannoni, 2004). Desde un punto de vista agrícola, los cambios en la textura son especialmente importantes ya que el reblandecimiento de la textura es el principal determinante de la vida útil poscosecha de la mayoría de frutos (Goulao y Oliveira, 2008; Contador et al., 2015). Además, la textura del fruto es uno de los atributos más importantes para la aceptación en el mercado, desde un punto de vista del consumidor (Contador et al., 2015). Los frutos blandos, como la fresa, tardan poco tiempo en adquirir una textura indeseable, excesivamente blanda, lo que aumenta su susceptibilidad al ataque de patógenos y reduce su vida útil a pocos días (Perkins-Veazie, 1995; Moya-León et al., 2019).

En general, está aceptado que el desensamblaje de la pared celular durante la maduración, así como la reducción de la adhesión celular como resultado de la disolución de las láminas medias, y la reducción de la turgencia celular, son las principales causas del reblandecimiento de los frutos (Brummell y Harpster, 2001; Brummell, 2006; Wang et al., 2018; Posé et al., 2019). De estos tres factores, del que más estudios se han realizado es del proceso de desmontaje de la pared celular durante la maduración del fruto; sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información disponible, no se ha conseguido establecer un modelo general de remodelación de pared celular para explicar el reblandecimiento del fruto (Wang et al., 2018). Estudios funcionales de genes codificantes de pectinasas, como la poligalacturonasa o la pectato liasa, señalan a la fracción de pectinas como un factor clave involucrado en este reblandecimiento (Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Posé et al., 2013).

Otra área de investigación muy activa en fresa es la regulación genética del cambio de color en el receptáculo. Es conocido que la antocianina es el pigmento principal que provoca el color rojo característico de la fresa madura (da Silva et al., 2007; Schaart et al., 2013). Mediante el uso de plantas transgénicas, se han caracterizado algunos genes clave involucrados en la biosíntesis y regulación de los compuestos flavonoides / fenilpropanoides (Schaart et al., 2013; Hytönen et al., 2018; Gao et al., 2019; Hua Wang et al., 2019). Estos estudios se han realizado con receptáculo de fresas entero, el cual es un órgano complejo que contienen diferentes tejidos que difieren en su metabolismo.

Por otro lado, los cultivos de tejidos pueden usarse como sistemas modelo para estudiar procesos de desarrollo, como la regulación de la diferenciación celular,

deficiencia mineral o respuesta al estrés (Liu et al., 2006; Fernandes et al., 2013; Perez-Garcia y Moreno-Risueno, 2018; Fenning, 2019). Los cultivos *in vitro* proporcionan una fuente de material vegetal uniforme, fácilmente manejable, y en los que se evitan complejas interacciones entre diferentes órganos y / o tejidos de plantas. En el caso de los frutos, cáliz y callos derivados de tejidos de frutos han sido empleados para estudiar diferentes aspectos de la maduración, como la regulación hormonal (Cohen, 1996), desarrollo del sabor y color (Ishida et al., 1993) o respuestas de defensa frente a patógenos (Belhadj et al., 2008). En fresa, se ha utilizado callo procedente de fruto inmaduro para analizar el metabolismo del fenol durante el periodo de cultivo *in vitro* y su relación con el crecimiento celular (Arnaldos et al., 2001, 2002). También se ha usado callo procedente de hoja de fresa para caracterizar la síntesis de antocianinas (Mori et al., 1994; Zhang y Furusaki, 1997). En cuanto al metabolismo de la pared celular, Alayón-Luaces et al. (2012) determinaron el efecto de los reguladores del crecimiento de las plantas en la composición de la pared celular de callo obtenido de manzanas en estadio inmaduro. Hasta donde sabemos, la remodelación de la pared celular asociada al reblandecimiento del fruto aún no se ha abordado utilizando cultivos de callos.

Los objetivos de este trabajo fueron, en primer lugar, producir líneas celulares a partir de receptáculos de fresa en diferentes etapas de desarrollo, y en segundo lugar, caracterizar estas líneas con el fin de determinar si podrían ser un sistema modelo útil en la obtención de información sobre el proceso de maduración del fruto, particularmente en la regulación de síntesis de antocianinas y en el desensamblaje de la pared celular asociado al reblandecimiento del receptáculo.

## IV.2 Materiales y métodos

### IV.2.1 Material vegetal y formación de callos

Se usaron hojas procedentes de plantas de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch. 'Chandler') micropropagadas *in vitro* en la formulación mineral N<sub>30</sub>K (Margara, 1984) con micronutrientes y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), como se describe en Barceló et al. (1998). También se usaron frutos de fresa en diferentes estadios (verde, blanco y rojo maduro) cosechados de plantas del mismo cultivar crecidas en invernadero.

Para la inducción de callos, se cultivaron veinte discos de hojas, procedentes de plantas *in vitro*, en placas Petri con medio N<sub>30</sub>K suplementado con benciladenina (BA) (0; 2,2 y 4,4  $\mu\text{M}$ ) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0; 11,3; 22,6 y 45,2  $\mu\text{M}$ ). Los frutos, 10-20 frutos por estado de maduración, se lavaron con agua, y se esterilizaron con una solución compuesta de lejía comercial al 10 % y 100  $\mu\text{l}$  de Tween-20 durante 15 min. Luego, los frutos se pelaron para eliminar los aquenios y se esterilizaron de nuevo como se describió anteriormente. Tras la esterilización se lavó el material 3 veces con agua estéril. Secciones de tejido cortical (0,5 cm  $\times$  0,5 cm) fueron diseccionadas y cultivadas en tubos de ensayo de 25  $\times$  150 mm con medio N<sub>30</sub>K suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu\text{M}$ . En todos los casos, el medio de cultivo fue solidificado con agar (8  $\text{gL}^{-1}$ ) y autoclavado durante 15 min a 121  $^{\circ}\text{C}$  y 1,05  $\text{kg} \times \text{cm}^{-2}$ . Los explantos fueron cultivados en oscuridad a 25  $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$ , y subcultivados en medio fresco cada dos semanas. Una vez inducidos, los callos de hoja y fruto se aislaron del explanto y se cultivaron en medio N<sub>30</sub>K suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu\text{M}$ , subcultivándose cada 4 semanas. Después, se seleccionó una sola línea celular de cada tipo de explanto y se multiplicó para estudios posteriores. Este proceso de inducción fue realizado por integrantes del proyecto AGR226 en el área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga.

Para el estudio del efecto de la formulación mineral y de la incubación en oscuridad vs luz en el crecimiento de las líneas se inocularon 0,3 g en tubos de ensayo que contenían 20 ml de medio N<sub>30</sub>K suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu\text{M}$  o LS (Linsmaier y Skoog, 1965) suplementado con BA 0,44  $\mu\text{M}$  y 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  (Mori et al., 1994; Edahiro y Seki, 2006), solidificados ambos medios con 8  $\text{gL}^{-1}$  de agar. Los cultivos fueron incubados en oscuridad o bajo un fotoperiodo de 16 h a 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , para ser pesados (peso fresco) tras 4 semanas de crecimiento. Se emplearon cinco tubos por tratamiento con cada línea celular, repitiéndose el experimento dos veces.

### IV.2.2 Efecto del ABA en la producción de antocianinas

Se cultivaron alícuotas de 300 mg de callo de cada línea celular en tubos de ensayo que contenían medio N<sub>30</sub>K suplementado con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Además, se utilizaron dos controles que consistían en callos incubados en medio N<sub>30</sub>K suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu\text{M}$  y sin suplementar con ningún regulador de crecimiento. Todos los tubos fueron incubados en luz bajo un fotoperiodo de 16 h a 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  durante 14 días. Tras 14 días de

incubación, se inspeccionó visualmente la aparición de pigmentos rojos en las diferentes muestras, para después ser congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Se emplearon cinco tubos por tratamiento, repitiéndose el experimento dos veces.

Para la extracción de antocianinas, el callo congelado se pulverizó con mortero y pistilo usando nitrógeno líquido. Posteriormente, se incubó 0,3 g de callo pulverizado en 3 ml de MeOH-HCl (99:1, v:v) durante 4 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. El homogenizado se centrifugó a 10000 g durante 15 min para medir la absorbancia del sobrenadante a 515 nm. Como la pelargonidina 3-glucósido es la principal antocianina presente en el fruto de fresa, la concentración de antocianinas se expresó como mg de pelargonidina 3-glucósido por cada 100 g de callo, usando un coeficiente de extinción molar de  $17333\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Giusti et al., 1999). Se realizaron tres extracciones independientes por cada tratamiento de cada línea celular.

## IV.2.3 Análisis de pared celular

### IV.2.3.1 Extracción de la pared celular

Se congelaron receptáculos de fresa en diferentes estadios de maduración y callo procedente de cada línea celular con nitrógeno líquido, para ser pulverizado y comenzar la extracción de pared celular con PAW (fenol: ácido acético: agua, 2:1:1, w:v:v) siguiendo el protocolo descrito en (Redgwell et al., 1992). De forma resumida, se extrajo la pared celular de 10 g de cada muestra mediante 20 ml de PAW, y tras centrifugar a 4000 g, el pellet se trató con DMSO al 90 % para disolver los acúmulos de almidón. El residuo final es el extracto de pared celular, el cual se liofilizó antes de comenzar el fraccionamiento. Se realizaron tres extracciones independientes de cada estadio de maduración del fruto y de cada línea celular.

### IV.2.3.2 Microarrays de perfiles completos de polímeros (CoMPP)

Se realizó un microarrays de carbohidratos de la pared celular siguiendo el procedimiento descrito por Kračun et al. (2017). Las fracciones de la pared celular se fueron extrayendo secuencialmente con agua estéril;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M; KOH 4 M y cadoxeno (1,2-diaminoetano al 31 % con 0,78 M de óxido de cadmio, (v:v)), usando un lisador de tejidos (Retsch MM400). En ambas fracciones alcalinas se añadió  $\text{NaBH}_4$  antes de ser usadas para evitar daños en la integridad de la hemicelulosa debido al poder reductor de ambos disolventes. Se usaron 10 mg de extracto de pared celular homogenizado en el lisador de tejidos con 500  $\mu\text{l}$  de agua a 30 Hz durante 20 min, para después seguir con una incubación de 1 hora con balanceo suave a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 2700 g durante 15 min, el sobrenadante se traspasó a otro tubo para ser almacenado, representando la fracción soluble en agua (fracción agua). El pellet fue usado para seguir con la extracción secuencial con el siguiente disolvente, siguiendo los mismos pasos de extracción. Los sobrenadantes de cada fracción se diluyeron cuatro veces (1:1 la primera vez y 1:5 las siguientes veces) y se usaron 4 réplicas técnicas, dando una submatriz de 16 puntos por muestra. Todas las

muestras se imprimieron simultáneamente en la misma hoja de nitrocelulosa. La impresión sobre nitrocelulosa se realizó con un ArrayJet Sprint (ArrayJet, Roslin, Reino Unido) y se cuantificó como describe Kračun et al. (2017). En resumen, el impreso en nitrocelulosa fue sondeado con los anticuerpos monoclonales (mAb) primarios diluidos (1/10) en tampón fosfato salino (PBS) suplementado con leche en polvo al 5 % p/v (MPBS). Los anticuerpos secundarios anti-rata o anti-ratón conjugados con la fosfatasa alcalina (Sigma) se diluyeron (1/5000) en MPBS. Los mAb primarios utilizados en este estudio (Tabla 4.1) (referencias de anticuerpos en Tabla Suplementaria 4.1) proceden de PlantProbes (Leeds, Reino Unido) excepto INRA-RU1 e INRA-RU2 que fueron proporcionados por la Dra. Marie Christine Ralet (Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes, Francia). Los microarrays desarrollados fueron escaneados (CanoScan 8800F) y convertidos a TIFF, para procesar las señales con el software de análisis de microarrays “ImaGene 6.0” (BioDiscovery), tal como se describió por Moller et al. (2007). El microarrays fue realizado por la Dra. Julia Schüchel en el “Department of Plant and Environmental Sciences” de la Universidad de Copenhague (Dinamarca).

El valor medio obtenido en las 4 réplicas de cada punto se ha representado en un “Heat Map” relacionando la intensidad de color con la señal media obtenida. La señal más alta fue establecida en 100, y todos los demás valores fueron normalizados respecto a este valor.

Tabla 4.1: Listado de anticuerpos primarios utilizados en el microarrays del perfil completo de polímeros (CoMPP) indicando el tipo de residuo de pectina principal al que se unen y el epitopo específico para el que fue diseñado.

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Epitopo</b>
Homogalacturonano (HG)	LM18	HG parcialmente metilado/no esterificado
	LM19	HG parcialmente metilado/no esterificado
	JIM5	HG parcialmente metilado/no esterificado
	JIM7	HG parcialmente metilado
Ramnogalacturonano 1 (RG-1)	LM5	RG-1 (1-4)-β-D-galactano
	LM6	RG-1 (1-5)-α-L-arabinano
	INRA-RU1	RG-1 (esqueleto)
	INRA-RU2	RG-1 (esqueleto)
	LM13	RG-1 (1-5)-α-L-arabinano (linealizado)
	LM26	RG1 ramificación(1,6-gal)(1-4)-β-D-galactano
Xiloglucano (XG)	LM15	XG (motivo XXXG)
	LM25	XG (motivo XXXG/XG galactosilado)

Heteroxilano (HX)	LM11	(1-4)- $\beta$ -D-xilano/arabinoxilano
	LM23	xilosil no acetilado en xilogalacturonano
	LM27	HX de monocotiledóneas
	LM28	glucuroxilano
Hetero-mannan	LM21	Hetero-mannan
Extensina	LM1	Extensinas
	JIM11	Extensinas
	JIM20	Extensinas
Proteína arabinogalactano (AGP)	JIM13	Proteínas arabinogalactanos

#### IV.2.3.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se realizó ELISA con la fracción carbonato sódico de la pared celular tanto de callos procedentes de hoja como de receptáculos en diferentes estadios de maduración: verde inmaduro, blanco y rojo. El procedimiento que se siguió es el mismo que el descrito en el apartado II.2.7.4 del Capítulo II de esta tesis, utilizando el anticuerpo monoclonal primario LM19 específico de HG que presenta un bajo grado de metilesterificación. En este ensayo preliminar se usaron dos réplicas por cada tipo de callo.

#### **IV.2.4 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos usando el software IBM SPSS Statistics (versión 25). Antes de realizar el ANOVA, se realizaron pruebas de Levene para analizar la homogeneidad de la varianza. Para la separación de medias se realizaron pruebas de Tukey o de Kruskal-Wallis, dependiendo de si las varianzas eran homogéneas o no, respectivamente. En el experimento de microarrays de carbohidratos, los valores normalizados obtenidos se sometieron a un Análisis Principal de Componentes utilizando el paquete FactoMineR de R. Todas las pruebas se realizaron a  $P = 0,05$ .

## IV.3 Resultados

### IV.3.1 Efecto del equilibrio hormonal y del tipo de explanto en el desarrollo del callo

Para optimizar la generación de callos a partir de tejido de fresa, los explantos de hoja, procedentes de plantas micropropagadas, se cultivaron en medio N<sub>30</sub>K suplementado con BA y 2,4-D a diferentes concentraciones. Se observó que la presencia de 2,4-D en el medio fue necesaria para inducir la formación de callos friables y que, por el contrario, BA disminuyó la producción de callo. Después de 8 semanas de cultivo, se formó mayor cantidad de callo cuando los explantos de hoja se cultivaron en medio suplementado únicamente con 2,4-D (Figura 4.1). Posteriormente, el callo inducido en los diferentes medios se volvió a inocular en el mismo medio fresco cultivándose durante 8 semanas más. En todos los medios que solo fueron suplementados con 2,4-D los callos mostraron una buena tasa de crecimiento, alcanzando valores de peso promedio tras las 16 semanas de cultivo de 4,6; 4,7 y 5,3 g en 11,3; 22,6 y 45,2  $\mu$ M de 2,4-D respectivamente. Sin embargo, el callo cultivado en medio suplementado con BA no aumentó su peso fresco en los subcultivos posteriores con medio fresco.

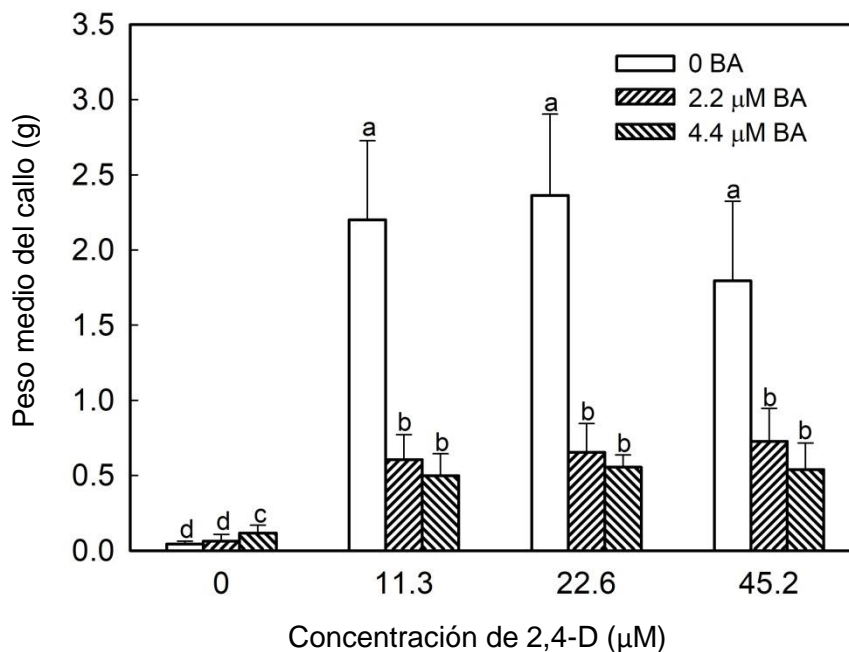


Figura 4.1: Efecto del equilibrio hormonal en el desarrollo de callos procedentes de explantos de hoja de fresa, cultivados en medio N<sub>30</sub>K. Los datos fueron tomados después de 8 semanas de cultivo en oscuridad (n = 10). Las medias que comparten la misma letra en todo el conjunto de datos no mostraron diferencias significativas tras realizar una prueba de Kruskal Wallis a P = 0,05.

Las secciones de receptáculo de fresa en tres estadios de desarrollo (verde inmaduro, blanco y rojo maduro) se cultivaron en medio N<sub>30</sub>K suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu$ M

para inducir la formación de callos. Aunque hubo una alta tasa de contaminación, especialmente en estadio rojo (> 60 %), se pudieron obtener varias líneas de cada estadio de fruto, lo que permitió seleccionar y multiplicar una de cada estadio de maduración (Figura 4.2).

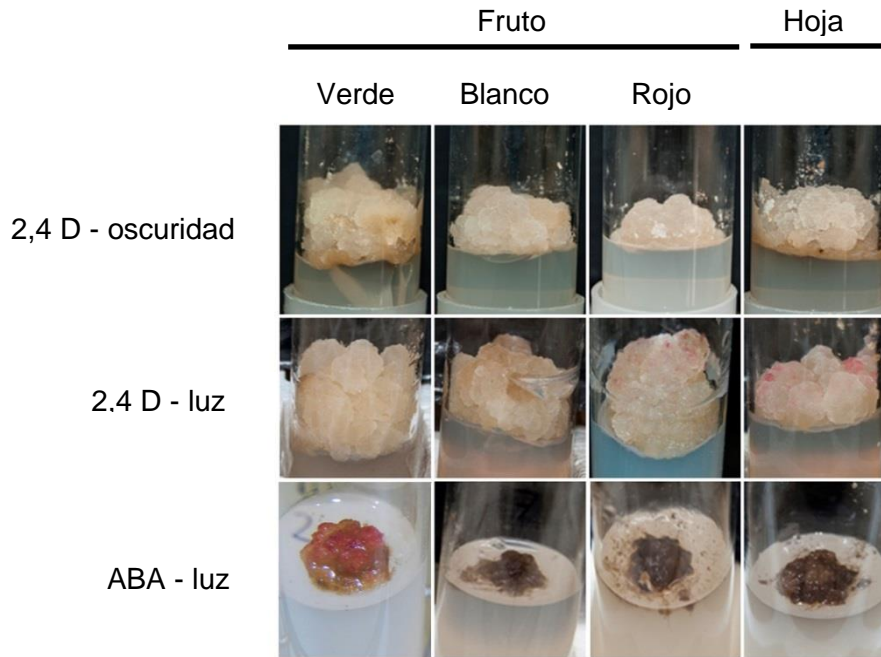


Figura 4.2: Aspecto de algunos callos obtenidos de hojas y frutos en diferentes etapas de desarrollo crecidos en medio  $N_{30}K$  suplementado con 2,4-D  $11,3 \mu M$  en oscuridad (2,4 D - oscuridad), el mismo medio bajo un fotoperíodo de 16 h a  $40 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  (2,4 D - luz) o medio  $N_{30}K$  con ABA  $1 \mu M$  incubado en luz (ABA - luz). Las fotografías fueron tomadas tras 4 semanas de cultivo en el caso de los medios con 2,4-D, y 2 semanas en el caso de ABA.

Con la línea seleccionada de cada estadio de desarrollo se realizó una curva de crecimiento en el medio  $N_{30}K$  suplementado con 2,4-D  $11,3 \mu M$  (Figura 4.3). Los callos procedentes del receptáculo en estadio verde fueron los que presentaron una mayor tasa de crecimiento, seguido de los obtenidos de receptáculo blanco y rojo. El callo procedente de hoja mostró un comportamiento intermedio del mostrado por las líneas de fruto blanco y rojo. El aspecto de las líneas también mostró diferencias tras 3 semanas de cultivo. Las líneas de fruto blanco y de fruto rojo eran de color blanco-beige con una textura cremosa y acuosa; el callo de fruto verde mostró un color similar, pero con una textura más firme y compacta; el callo de hoja tenía un color amarillento y una textura muy blanda.

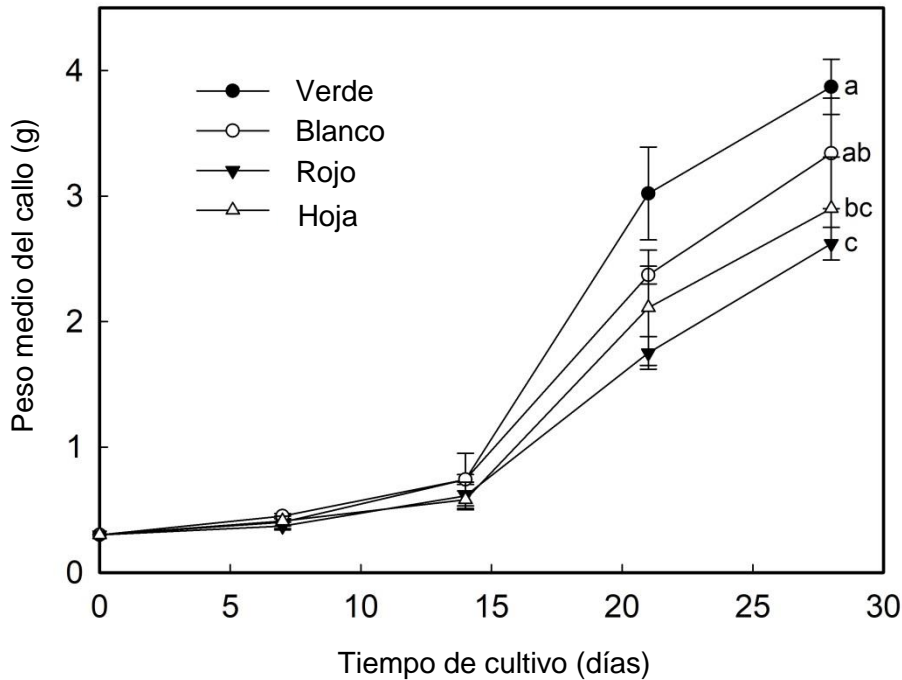


Figura 4.3: Curva de crecimiento de las diferentes líneas celulares obtenidas de hoja y de receptáculo en estadio verde, blanco y rojo. Los datos representan las medias  $\pm$  SD durante 28 días de cultivo ( $n = 10$ ). Las medias que comparten las mismas letras no mostraron diferencias significativas en el día 28 de muestreo mediante la prueba de Tukey a  $P = 0,05$ .

Para optimizar las condiciones de proliferación de los callos de fresa, se analizó el efecto de la formulación mineral y de la iluminación. Para ello, los callos fueron cultivados en medio  $N_{30}K$  suplementado con 2,4-D  $11,3 \mu M$  o en medio compuesto por la formulación mineral LS suplementado con BA  $0,44 \mu M$  y 2,4-D  $4,5 \mu M$  como propusieron Mori et al. (1994); y en condiciones de oscuridad o luz (fotoperiodo de 16 h a  $40 \mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ). En todas las líneas, los callos cultivados con el medio basado en la formulación mineral LS mostraron una baja tasa de crecimiento, adquiriendo un color marrón tras 4 semanas de cultivo (Figura 4.4). En cuanto al efecto de la luz, los callos cultivados en  $N_{30}K$  suplementado con 2,4-D  $11,3 \mu M$  e incubados en luz mostraron un mayor incremento de peso fresco que los incubados en oscuridad, siendo esta diferencia significativa en el caso de las líneas de fruto verde y blanco (Figura 4.4). Adicionalmente, la incubación en luz provocó en los callos procedentes de hoja y de fruto rojo la aparición de pigmentos rojos tras tres semanas de cultivo. Sin embargo, en las líneas de fruto verde y blanco esta pigmentación apenas era visible (Figura 4.2). El valor medio del contenido de antocianinas, medido como pelargonidin-3-glucósido, fue de  $0,24 \pm 0,03$  mg / 100 g de peso fresco en callos cultivados en oscuridad; cuando los callos se cultivaron en luz la cantidad de antocianina aumentó y, los valores medios variaron entre  $0,34 \pm 0,07$  y  $0,45 \pm 0,09$  mg / 100 g, correspondientes a los valores obtenidos con callo de fruto verde y de hoja, respectivamente.

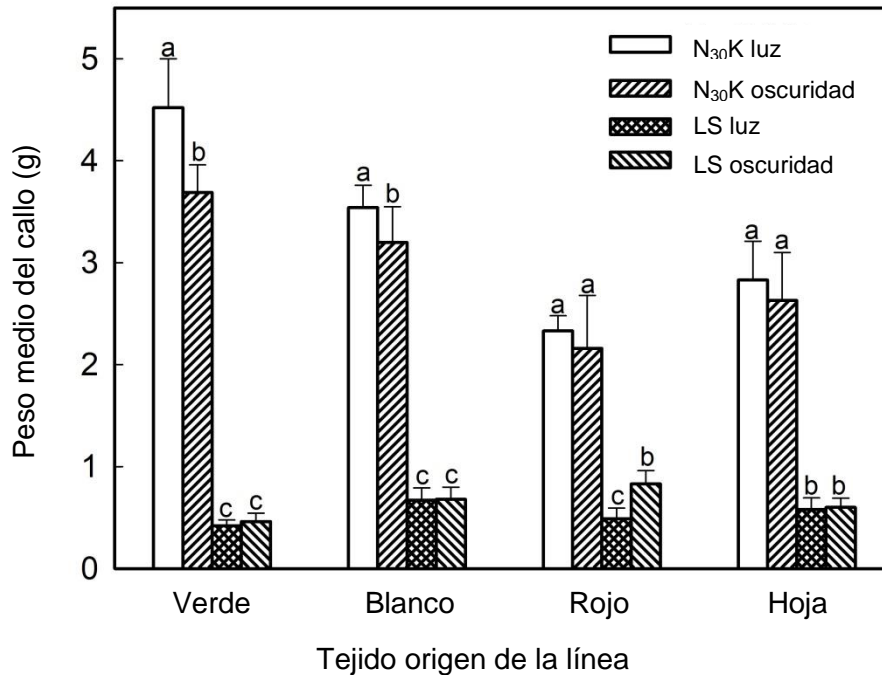


Figura 4.4: Efecto del medio de cultivo y de la incubación en luz en el crecimiento de callos obtenidos de hojas y frutos de fresa en diferentes etapas de desarrollo (n = 10). Dentro de cada línea de callo, los grupos que comparten la misma letra no mostraron diferencias significativas tras la prueba de Kruskal Wallis a P = 0,05.

### IV.3.2 Efecto del ABA en la producción de antocianinas

Para determinar si el ABA podía mejorar la producción de antocianinas en los callos incubados en luz, callo procedente de las distintas líneas fue crecido en medio N<sub>30</sub>K suplementado con diferentes concentraciones de ABA (en ausencia de auxina). Además, se hizo un tratamiento control con medio estándar (suplementado con 2,4-D 11,3  $\mu$ M) y otro tratamiento con medio sin reguladores del crecimiento. Como se observó anteriormente, al incubar el callo con medio estándar en luz, se indujo la producción de pigmentos, especialmente en las líneas celulares de hoja y de fruto rojo (Figura 4.5). La sustitución de auxina por ABA, con la concentración más baja (1  $\mu$ M), provocó una mayor producción de antocianinas en callos de la línea procedente de fruto verde y, en menor medida, en la línea de fruto rojo (Figuras 4.2 y 4.5). Sin embargo, el callo procedente de las líneas de fruto blanco y de hoja no respondió a este tratamiento. Tanto al aplicar ABA a mayor concentración como al no añadir reguladores de crecimiento al medio, disminuyó la viabilidad celular media, mostrando los callos necrosis prácticamente completa tras 4 semanas de cultivo.

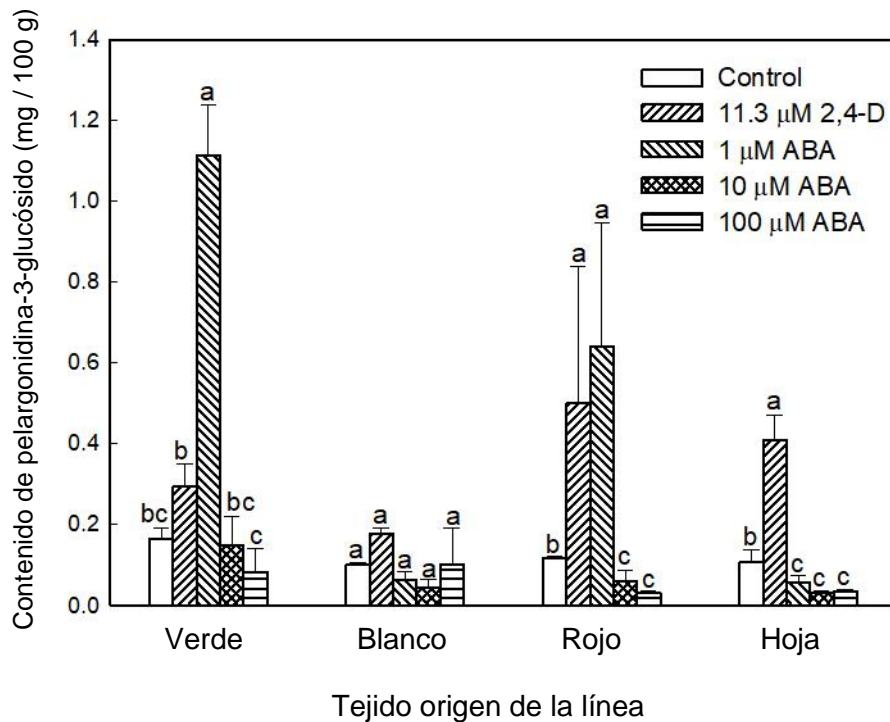


Figura 4.5: Concentración de antocianinas producidas por callos obtenidos de hojas y frutos de fresa en diferentes estadios de desarrollo, tras 2 semanas en medio N<sub>30</sub>K con 2,4-D o ABA en presencia de luz. Control: callos incubados en ausencia de reguladores de crecimiento (n = 10). Dentro de cada línea celular, los grupos que comparten la misma letra no mostraron diferencias significativas por la prueba de Kruskal Wallis a P = 0,05.

### IV.3.3 Análisis de la composición de la pared celular por CoMPP

Se extrajo la pared celular de los cultivos celulares procedentes de hoja y de receptáculos para después ser fraccionada mediante el uso de diferentes disolventes, produciendo fracciones ricas en pectinas solubles y unidas por enlaces éster (agua y carbonato sódico, respectivamente), en hemicelulosa formada principalmente por xiloglucanos (XG) (KOH 4 M), y en polisacáridos unidos fuertemente a las microfibrillas de celulosa (cadoxeno). Para comparar estas fracciones de pared celular, se realizó la misma extracción y el mismo fraccionamiento con receptáculos de fresa en estadio verde, blanco y rojo. La Figura 4.6 muestra en forma de "Heat Map" los resultados del microarrays de carbohidratos. El anticuerpo monoclonal LM27, específico de heteroxilano (HX) procedente de plantas monocotiledóneas, se incluyó como control negativo y, como se esperaba, no emitió señal en ninguna muestra analizada. En el caso de las paredes celulares de receptáculos, el homogalacturonano (HG) metilesterificado, reconocido por JIM7, era abundante en las fracciones agua de frutos verdes y blancos, mientras que la fracción agua de frutos rojos mostró mayor cantidad de HG con bajo grado de metilesterificación, reconocido por JIM5. En las fracciones carbonato, KOH 4 M y cadoxeno también se detectó señal de HG y de ramnogalacturonano I (RG-1), indicando que una gran fracción de pectinas se

encontraban atrapadas en hemicelulosa y / o en microfibrillas de celulosa. En general, la cantidad de pectinas extraídas fue en aumento de fruto verde a blanco, y menor en fruto rojo. Las fracciones de KOH y cadoxeno contenían grandes cantidades de XG, reconocido por los anticuerpos LM15 y LM25. La cantidad de XG extraído fue en aumento de fruto verde a blanco. Sin embargo, en frutos rojos la señal de LM15 (para el motivo XXXG de XG) fue menor, mientras que la señal de LM25 (reconoce residuos de galactosilo en XG) fue mayor. Los glucuronoxilanos, reconocido por LM28, también fueron abundantes en las fracciones KOH y cadoxeno de frutos verdes y rojos. La señal detectada de las proteínas arabinogalactano (JIM13) fue baja en la fracción KOH, aumentando conforme avanzan los estadios de desarrollo.

El perfil de polisacáridos mostrado por los callos de las líneas procedentes de receptáculo de fresa fue bastante diferente al descrito en los frutos. En todas las fracciones de la pared celular, los anticuerpos monoclonales de pectinas HG y RG-1 mostraron una señal muy baja. La cantidad de XG y xilanos en las fracciones KOH y cadoxeno también fueron más bajas que la descrita en frutos. Sin embargo, los tres anticuerpos monoclonales específicos de las extensinas (LM1, JIM11 y JIM20), mostraron una señal fuerte en las fracciones de las líneas celulares, siendo más alto el valor en la fracción de carbonato sódico. En las paredes celulares de frutos y en la fracción agua de las líneas celulares, no se detectaron epítomos de extensinas. El anticuerpo LM23, específico de xilogalacturonano, también mostró un perfil diferente en receptáculos y líneas celulares, detectándose en todas las fracciones de los callos, a excepción de la fracción agua, mientras que en los receptáculos no se detectó.

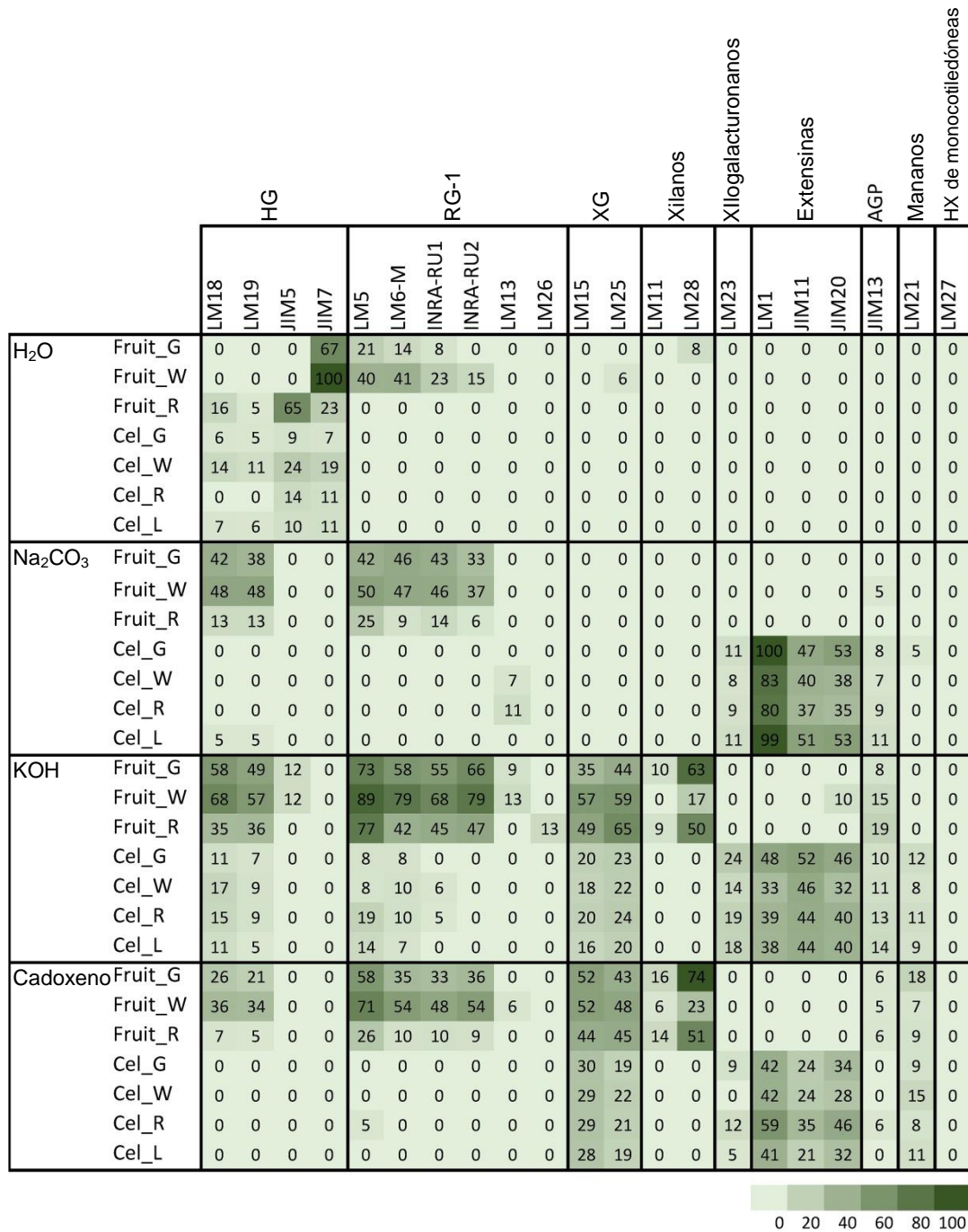


Figura 4.6: Abundancia relativa de epítomos de la pared celular reconocidos por diferentes anticuerpos monoclonales en fracciones de la pared celular de frutos de fresa y de callos de líneas obtenidas de hojas y de receptáculos en diferentes estadios de desarrollo. Se asignó un valor de 100 a la señal media puntual más alta, siendo las demás señales normalizadas en consecuencia. Fruit\_G: fruto verde inmaduro; Fruit\_W: fruto blanco; Fruit\_R: fruto rojo maduro; Cel\_G: callo de fruto verde; Cel\_W: callo de fruto blanco; Cel\_R: callo de fruto rojo maduro; Cel\_L: callo de hoja.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para proporcionar una visión general de la separación que hay entre los diferentes grupos de muestra (Figuras 4.7 y 4.8). En las cuatro fracciones de la pared celular, el primer componente (DIM1) mostró la mayor variabilidad en el conjunto de datos ( $> 67\%$ ). Las muestras de los frutos y de los cultivos celulares se separaron a lo largo de este primer componente, situando la fracción agua de la muestra de fruto blanco en el extremo opuesto de las muestras de la fracción agua procedentes de callos, siendo todas ellas similares entre sí. La fracción agua procedente de fruto rojo fue situada junto a las fracciones agua de los callos (cuadrante izquierdo), mientras que la fracción agua procedente de fruto verde quedó en una posición intermedia entre la de fruto blanco y el resto. En la fracción carbonato las muestras procedentes de callos también mostraron una alta similitud entre ellas, y la muestra de fruto blanco volvió a ser situada en el extremo opuesto. La muestra de fruto verde fue situada muy cerca de la de fruto blanco. La muestra de fruto rojo en esta fracción se mostró más similar a las otras dos muestras de frutos que a las de los callos (Figura 4.7). Anticuerpos monoclonales específicos de polisacáridos neutros y del esqueleto de RG-1 (LM5, LM6.M, INRA-RU1), así como de HG metilesterificado (JIM7), se correlacionaron positivamente en la primera dimensión de las fracciones agua. En la fracción carbonato sódico, los anticuerpos monoclonales específicos de RG-1 y HG de baja metilación (LM18, LM19), contribuyeron positivamente al primer componente principal, mientras que los anticuerpos de extensina (JIM11, JIM29 y LM1) contribuyeron negativamente. Las fracciones KOH y cadoxeno, siguieron una tendencia similar, aunque los anticuerpos relacionados con XG (LM23 y LM25) también correlacionaron negativamente con el primer componente (Figura 4.8). Los resultados obtenidos indican que la primera dimensión de PCA, contabiliza la mayor parte de la variabilidad de las muestras, relacionándose con la cantidad de pectinas en la fracción agua y la sustitución de epitopos de pectinas por epitopos de extensinas en el resto de fracciones.

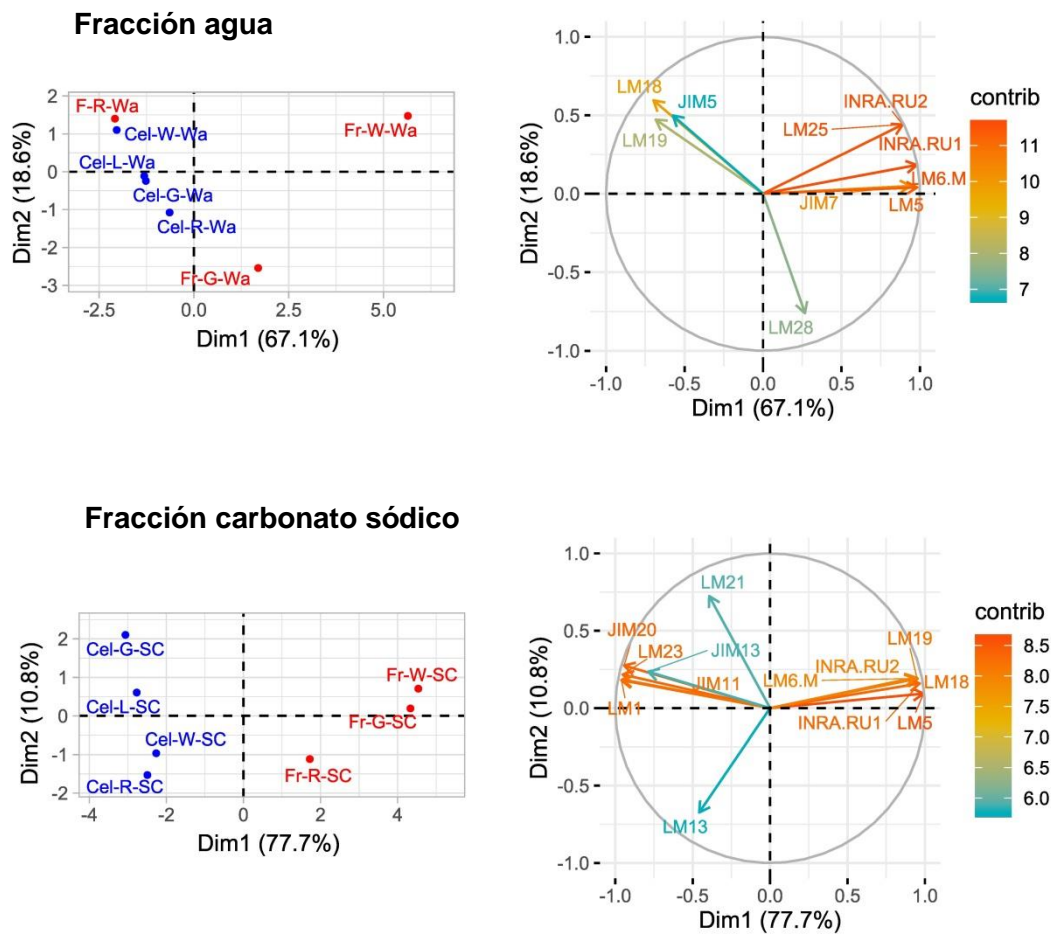


Figura 4.7: Análisis PCA de los datos obtenidos en el microarrays de carbohidratos de fracciones enriquecidas con pectina (fracciones agua y carbonato sódico). Los gráficos “biplot” se muestran a la izquierda y los gráficos de variables a la derecha. La escala de colores en los gráficos de variables representa la contribución promedio de la variable a la variación explicada por los dos componentes principales. Fr: fruto; Cel: cultivo celular; G: estadio verde; W: estadio blanco; R: estadio rojo; Wa: fracción agua; SC: fracción de carbonato sódico.

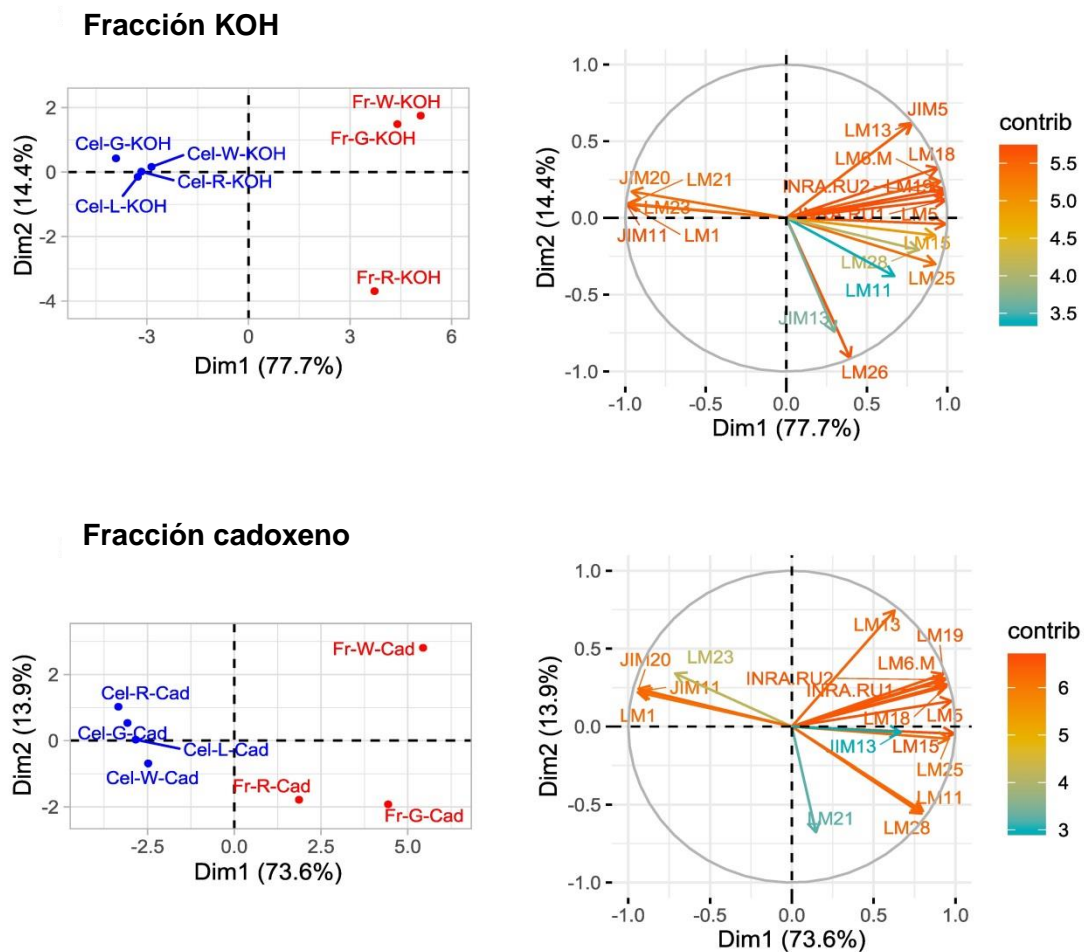


Figura 4.8: Análisis PCA de datos obtenidos en el microarrays de carbohidratos de fracciones ricas en glucanos de la pared primaria (fracciones KOH y cadoxeno). Los gráficos de puntuación de factores se muestran a la izquierda y los gráficos de variables a la derecha. La escala de color en los gráficos de variables representa la contribución promedio de la variable a la variación explicada por los dos componentes principales. Fr: fruto; Cel: cultivo celular; G: estadio verde; W: estadio blanco; R: estadio rojo; KOH: fracción KOH 4 M; Cad: fracción cadoxeno.

Todo el conjunto de datos del microarrays fue sometido a un análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 4.9; Figura Suplementaria 4.1). Las muestras se organizaron en tres grupos o “clusters” principales (Figura 4.9A). El grupo más diferenciado comprende fracciones de carbonato sódico, KOH y cadoxeno de cultivos celulares procedentes de receptáculos. Este grupo se caracterizó por señales fuertes de anticuerpos específicos de extensina (JIM20, JIM11, LM1), de xilogalacturonanos (LM23) y de mananos (LM21), y señales débiles de RG-1 (INRA-RU1, LM5, LM6M, INRA-RU2) y HG (LM19, LM18). El resto de muestras conforman dos grupos donde uno incluye la fracción agua de frutos y de los cultivos celulares, y la fracción carbonato sódico de frutos. Este grupo se definió por la alta señal de los epitopos de HG (JIM5 y JIM7) y la baja señal mostrada por XG (LM15 y LM25) y extensinas. Finalmente, el tercer grupo comprendió las fracciones KOH y cadoxeno de los frutos. Este clado se caracterizó por la gran

abundancia de epítomos de XG, RG-1 y HG, acompañado de una baja cantidad de epítomos de extensinas. Este agrupamiento de las muestras se ve reforzado por el mapa de factor individual (Figura 4.9B). En este mapa el grupo 1 de muestras descrito anteriormente es separado de las muestras del grupo 2 y del grupo 3 mediante el primer componente (Dim 1), a excepción de las fracciones carbonato sódico de fruto verde y fruto blanco (ambas del grupo 3) que están cercanas a las fracciones cadoxeno de fruto rojo, blanco y verde (grupo 1). Al separar las muestras con el segundo componente (Dim 2) las muestras del grupo 2 quedan situadas en el cuadrante inferior, mientras que las muestras de los otros dos grupos quedan organizadas en el cuadrante superior. De esta forma las muestras del grupo 1 quedarían situadas en el cuadrante superior derecho, las muestras del grupo 3 en el cuadrante superior izquierdo y las muestras del grupo 2 en los cuadrantes inferiores, estando la mayoría de estas muestras situadas en el cuadrante inferior izquierdo.

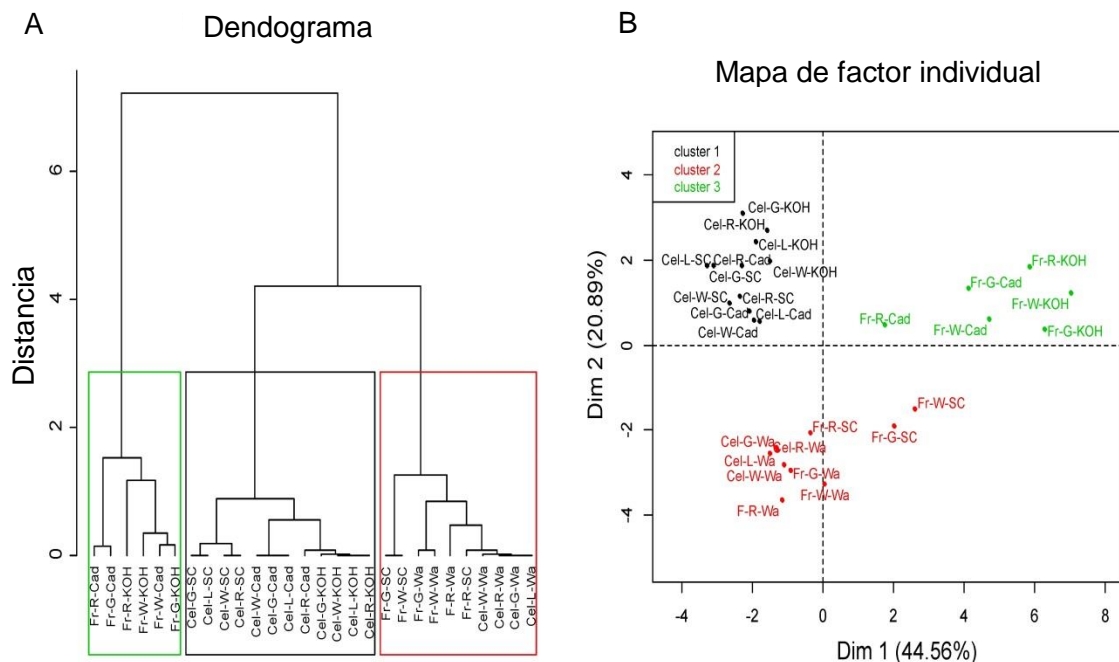


Figura 4.9: Agrupación jerárquica de los datos obtenidos en el microarrays de carbohidratos. Dendrograma basado en distancias euclidianas (A) y el mapa de factor individual correspondiente (B) de las diferentes muestras de pared celular. Fr: fruto; Cel: cultivo celular; G: estadio verde; W: estadio blanco; R: estadio rojo; Wa: fracción agua; SC: fracción carbonato sódico; KOH: fracción KOH 4 M, Cad: fracción cadoxeno.

Mediante ELISA se hizo una primera aproximación a la composición de pectinas de los callos de las líneas celulares (Figura 4.10), haciendo un ensayo con las fracciones carbonato sódico usando el anticuerpo monoclonal LM19 (específico de HG con bajo grado de metilesterificación). En este ensayo, se observan diferencias parecidas en la cantidad de HG con bajo grado de metilesterificación en la fracción carbonato entre las diferentes líneas celulares procedentes de receptáculos en diferentes estadios y las

mostradas por los frutos en diferentes estadios de maduración en el microarrays (Figura 4.6). La línea celular procedente de receptáculo en estadio verde muestra una señal del anticuerpo LM19 media más baja que la línea procedente de fruto blanco, pero más alta que la línea procedente de fruto rojo, siendo la misma tendencia que la mostrada por los respectivos estadios de desarrollo de fruto en el microarrays. La línea procedente de hoja mostró un valor intermedio entre el mostrado por la línea de fruto verde y la línea de fruto blanco.

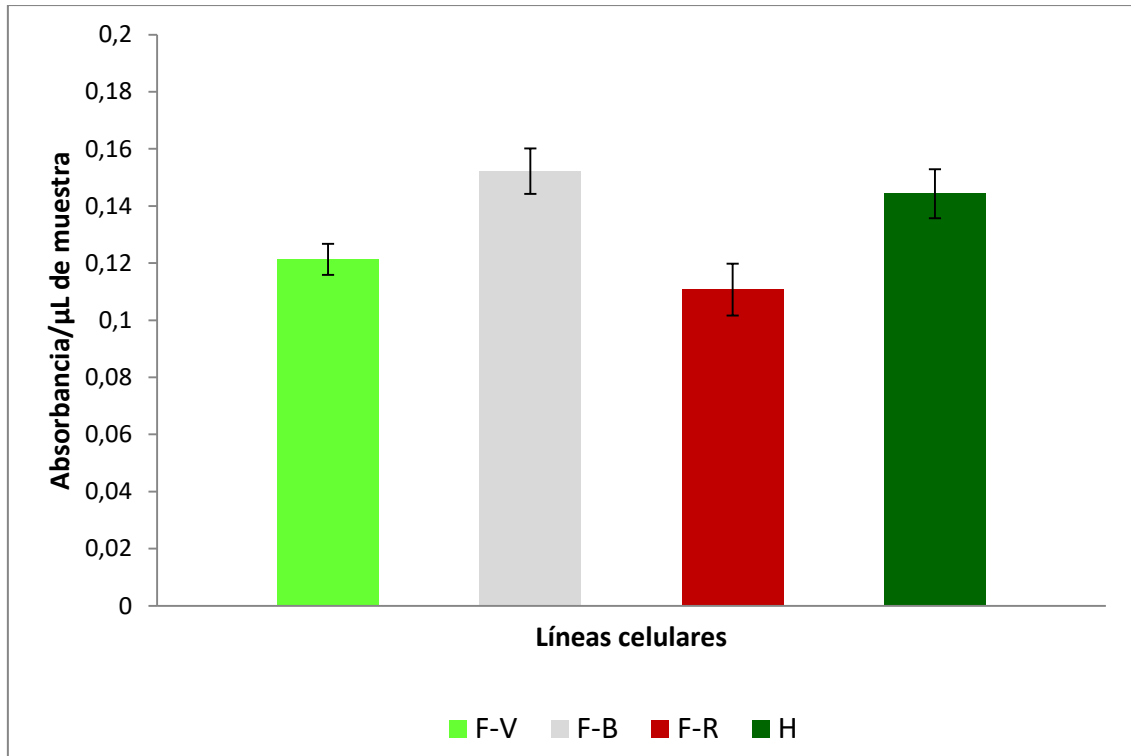


Figura 4.10: Contenido de epitopos de HG con bajo grado de metilesterificación (anticuerpo LM19), estimado como absorbancia a 450 nm /  $\mu\text{L}$  de muestra, en la fracción  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  de las diferentes líneas celulares. F-V: fruto verde inmaduro; F-B: fruto blanco; F-R: fruto rojo; H: hoja.

## IV.4 Discusión

### IV.4.1 Desarrollo de los cultivos de callos a partir de receptáculos de fresa

En trabajos previos se ha inducido la producción de callos en fresa a partir de hojas (Mori et al., 1994), pecíolos (Edahiro y Seki, 2006), meristemos apicales (Sato et al., 1996) y fruto inmaduro (Hong et al., 1989; Arnaldos et al., 2001) usando medio MS o LS suplementado con 2,4-D. También se ha descrito que N<sub>30</sub>K, una formulación mineral con una fuerza iónica más baja que la MS, es más adecuada para la micropropagación y regeneración de fresa 'Chandler' (López-Aranda et al., 1994; Barceló et al., 1998). En esta investigación, este medio se usó con éxito para obtener callos de explantos de hoja con este genotipo. Se necesitó la presencia de 2,4-D para inducir la formación de los callos, aunque altas concentraciones de auxina provocaron una reducción en la proliferación, tal como reportaron anteriormente en algunos genotipos de fresa Hong et al. (1989). Por el contrario, la adición de BA al medio de inducción disminuyó la cantidad de callo formado. Asahira y Kano, (1977) también describieron que la formación de callo se fomentaba con medio suplementado con 2,4-D que carecía de BA. El medio N<sub>30</sub>K suplementado con una baja concentración de 2,4-D también fue adecuado para el aislamiento y proliferación de los cultivos celulares procedentes de receptáculos de fresa en diferentes estadios de desarrollo. Los explantos de frutos rojos fueron los que mostraron la menor capacidad de desarrollar callos en este medio. Del mismo modo, las tasas de proliferación obtenidas de las diferentes líneas celulares disminuyeron en función del estado de desarrollo del explanto inicial, siendo mayor en frutos verdes inmaduros y menor en frutos maduros. Esto ya fue observado por Hong et al. (1989), quienes también describieron que la tasa de formación de callos disminuía conforme más avanzado fuera el estadio de desarrollo del explanto, pero en ese trabajo no pudieron obtener callos de frutos casi maduros, recolectados 4 semanas tras la floración. En otras especies también se han elegido frutos en estadio inmaduro como el explanto preferido para iniciar líneas celulares (Alayón-Luaces et al., 2008). Hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera vez que se han obtenido cultivos de callo de frutos maduros altamente diferenciados.

### IV.4.2 Producción de antocianinas en líneas celulares procedentes de receptáculo

La luz no tuvo un gran efecto sobre la tasa de crecimiento de los cultivos de callos; sin embargo, indujo la acumulación de pigmentación roja en las líneas de callo procedentes de hoja y de fruto maduro. Un hecho similar fue observado por Hong et al. (1989) en cv. "Brighton". En el receptáculo de fresa, la biosíntesis de antocianinas está regulada por el factor de transcripción MYB10. Su gen codificante es expresado principalmente en receptáculo maduro y controla directamente la expresión de genes implicados en la vía flavonoide / fenilpropanoide, incluyendo genes de producción de antocianinas (Medina-Puche et al., 2014). Kadomura-Ishikawa et al. (2015) descubrieron que la luz y el ABA regulan independientemente la expresión de FaMYB10 y, por lo tanto, la producción de antocianinas en frutos de fresa, siendo su

efecto aditivo. La sustitución de 2,4-D por ABA, a bajas concentraciones, aumentó significativamente la producción de antocianinas en callos procedentes de fruto verde inmaduro, pero no así la de otras líneas. ABA y auxina juegan efectos antagónicos en la maduración del fruto de fresa. La disminución de la biosíntesis de ABA en receptáculos inmaduros por silenciamiento génico mediante virus de *FaNCDE1*, gen clave en la biosíntesis de esta hormona, o la inyección del inhibidor de ABA fluridona, provocaron un deterioro en el desarrollo del fruto, obteniendo un fenotipo de receptáculo blanquecino (Jia et al., 2011). Un fenotipo similar se obtuvo al regular negativamente los receptores de ABA (Chai et al., 2011). Contrariamente al ABA, las auxinas producidas en los aquenios alcanzan un nivel máximo en el receptáculo en estadio verde (Estrada-Johnson et al., 2017) y, cuando los aquenios son eliminados, se produce una acumulación de antocianinas (Given et al., 1988a). Los resultados obtenidos en esta investigación indican grandes diferencias en la regulación de la vía de los flavonoides entre las diferentes líneas celulares procedentes de frutos. El equilibrio hormonal de auxina/ABA parece ser el principal regulador de la producción de antocianinas en la línea celular de frutos verdes; sin embargo, los cultivos de frutos maduros responden principalmente a la luz, mientras que la línea procedente de receptáculo en estadio blanco mostró una baja capacidad de producción de antocianinas. El comportamiento diferencial de las líneas celulares procedentes de receptáculo en diferentes estadios podría ser usado para realizar un estudio genético que contribuya a entender la regulación de la acumulación de pigmentos en el fruto de fresa.

#### IV.4.3 Caracterización de paredes celulares procedentes de cultivos celulares

El perfil de pectina en las fracciones de pared celular extraídas de los frutos mostró que la cantidad de epítomos de HG y RG-1 aumentaron con el desarrollo de fruto verde a blanco y luego disminuyeron en estadio rojo maduro, hasta alcanzar niveles muy bajos. Este patrón se observó en todas las fracciones analizadas excepto en la fracción agua de fruto maduro, ya que mostraba una alta señal emitida por el anticuerpo monoclonal JIM5, específico de HG con bajo grado de metilesterificación. Estos resultados respaldan estudios previos de solubilización de pectina en los que, de forma resumida, se observa una reducción de pectinas fuertemente unidas a la pared celular primaria concomitante a un aumento de pectinas solubles en agua, siendo este proceso característico en la remodelación de la pared celular durante la maduración de la fresa (Redgwell et al., 1997a; Quesada et al., 2009; Paniagua et al., 2017; Moya-León et al., 2019). Es de destacar que una gran fracción de pectinas, especialmente RG-1, se extrajeron con KOH y cadoxeno. La pectina y el xiloglucano pueden estar vinculados covalentemente (Thompson y Fry, 2000; Popper y Fry, 2005) y, recientemente, Cornuault et al. (2018) descubrieron que una subpoblación de pectina estaba unida a XG en la fracción KOH de diferentes frutos, incluido la fresa. En cuanto a la hemicelulosa, se ha descrito anteriormente en diferentes cultivares que disminuye durante la maduración de la fresa junto con la firmeza del fruto (Koh y Melton, 2002; Rosli et al., 2004). Sin embargo, los resultados del microarrays no apuntaron en la misma dirección, ya que la intensidad de señal de los epítomos de XG cambiaron poco en los diferentes estadios de desarrollo de fruto 'Chandler'. No obstante, los resultados

obtenidos sugieren un cambio en la estructura química de XG en el fruto maduro, aumentando la cantidad de XG galactosilado, reconocido por LM25. También se detectaron cantidades significativas de glucuronoxilanos en fracciones KOH y cadoxeno, siendo algo menor en fruto blanco. Los heteroxilanos no son abundantes en las paredes primarias de las plantas dicotiledóneas y su rol es desconocido. Cornuault et al. (2015) encontraron glucuronoxilano asociado con la fracción enriquecida en RG-1 de tubérculos de patatas. Sin embargo, estos resultados indicaban una correlación negativa entre la señal de glucuronoxilanos y la abundancia de RG-1.

Los perfiles de polisacáridos de los cultivos celulares fueron bastante diferentes de los mostrados por los frutos. En las paredes celulares de los callos, los anticuerpos específicos de pectinas mostraron una señal muy baja. Por el contrario, los extractos de pared celular de callo estaban enriquecidos en epítomos de extensinas asociadas fuertemente a pectinas (fracción carbonato sódico) y glicanos matriciales. Las extensinas son una de las principales clases de glucoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) que contienen múltiples repeticiones Ser-(Pro)<sub>3-5</sub> y motivos Tyr que actúan como sitios de unión (Lamport et al., 2011; Marzol et al., 2018). Estas proteínas están involucradas en la construcción y en el mantenimiento de la pared celular primaria. Durante la formación de la pared celular, la capacidad de autoensamblaje de las extensinas genera redes de andamios que pueden servir como plantilla para el ensamblaje de la matriz de pectina debido a las interacciones ácido-base entre las extensinas y las pectinas (Lamport et al., 2011). Por otra parte, la reticulación de extensinas fortalece las paredes celulares. De hecho el estrés biótico y abiótico, como puede ser el ataque de patógenos o las heridas, inducen la biosíntesis de extensina (Merkouropoulos y Shirsat, 2003; Liu et al., 2016; Portieles et al., 2018). En uva, los epítomos de extensina, detectados por los anticuerpos LM1 y JIM20, aumentaron en el envero, cuando comienza la maduración. Sin embargo, su función fisiológica no está clara (Moore et al., 2014). Los resultados del análisis por CoMPP con frutos de fresa en diferentes estadios fueron diferentes a los comentados en uva, ya que la extensina es un componente minoritario de la pared celular del que no se ha detectado variación durante la maduración. El alto contenido de extensina en los cultivos celulares de fresa puede reflejar una pared celular fuertemente reticulada, y podría estar relacionado con las condiciones estresantes que sufren los tejidos al estar *in vitro*. De hecho, también se ha encontrado una gran cantidad extensinas en células en suspensión de otras especies (Dey et al., 1997; Jackson et al., 2001). La señal más fuerte de epítomos de extensina se detectó en la fracción carbonato sódico, especialmente en las líneas celulares de hoja y de fruto verde, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar vinculadas a las pectinas, tal como sugirió Nuñez et al. (2009). Esta interacción también podría explicar la baja señal mostrada por los anticuerpos específicos de pectinas, siendo enmascarada esta señal por los complejos formados pectina-extensina, evitándose la unión de los anticuerpos a los epítomos de HG y RG-1. De hecho, las pectinas y otros polisacáridos de la pared celular podrían estar estrechamente relacionados en la pared celular de los callos, haciéndolas menos extraíbles en las fracciones solubilizadas.

Por otro lado, se detectó la señal de LM23 en todas las fracciones de la pared celular de los callos, a excepción de la fracción agua, indicando la presencia de epítomos de xilogalacturonano (XGA). Esta pectina no ha sido descrita previamente en el fruto de

fresa, pero se ha encontrado en regiones de alta ramificación de pectinas en manzana, otro miembro de la familia de rosáceas (Schols et al., 1995). XGA también ha sido asociado a la adhesión celular en cultivos celulares procedentes de zanahoria (Sato, 1998).

Los microarrays de carbohidratos proporcionan información sobre los niveles relativos de los epítomos específicos de polisacáridos, pero no permite cuantificar niveles absolutos de componentes de la pared celular (Moller et al., 2007). En los cultivos de callos, las grandes cantidades de extensina y la aparente menor presencia de epítomos de pectina, dificulta la comparación de estas paredes celulares con sus muestras correspondientes en frutos siguiendo esta metodología. Sin embargo, la agrupación jerárquica de datos del microarrays incluyó en el mismo grupo, las fracciones agua de ambos tipos de muestra y la fracción carbonato sódico de los frutos. Por lo tanto, es probable que la composición de pectinas en estas fracciones fuera comparable. Como se indicó anteriormente, los poliuronidos sufren muchas alteraciones durante la maduración de la fresa (Paniagua et al., 2017; Moya-León et al., 2019). Otras técnicas como el análisis estructural de carbohidratos, serían necesarias para determinar con precisión si las paredes celulares de los frutos en diferentes estadios de desarrollo y sus líneas celulares correspondientes son equivalentes. Un análisis preliminar mediante ELISA mostró que los valores de HG de baja metilación, detectado por LM19, en la fracción carbonato sódico siguió la misma tendencia en los cultivos celulares que la observada en el microarrays de frutos en diferentes estadios. Los experimentos están en progreso para determinar si ocurre lo mismo con otros epítomos de pectina.

# Conclusions

1. FaNAC2 and FaNAC3 are two transcription factors, located in the nucleus, that are involved in fruit development and ripening. Down-regulation of *FaNAC2* and *FaNAC3* gene expression separately in strawberry plants cause a reduction in fruit size and changes in gene expression of a group of genes related to the ripening process. However, in the fruit ripening process FaNAC2 could play a more important role than FaNAC3 and would act as a positive regulator of ripening involved in anthocyanin production and in the remodeling of the primary cell wall.
2. *FaNAC2* down-regulation alters the composition of the cellulose and hemicellulose, pectins and proteins domains of the cell wall of the strawberry fruit cells, suggesting a role of FaNAC2 as a negative regulator of elements related to defense against pathogens in the primary cell wall (such as cellulose, callose and arabinogalactan proteins). *FaNAC3* down-regulation caused more subtle changes in components of the pectin domain that did not influence the firmness of the fruit.
3. *FaRGlyase 1* is a gene involved in the softening of the cell wall during ripening as down-regulation of its expression in strawberry fruits shows an increase of several pectin components, including the backbone and the side chains of RG-1, with the consequent increase of firmness. The depolymerization of RG-1 seems to occur preferentially in the middle lamella, and this fact may be important for the regulation of glucuronoxylans in the primary cell wall. The reduction of glucuronoxylans after down-regulated *FaRGlyase 1* gene could indicate a possible connection between the cellulose-hemicellulose and pectin domains through glucuronoxylans and RG-1.
4. Cell lines obtained from strawberry receptacles at the stages of unripe-green, white and ripe-red and from leaf show a different proliferation capacity, being greater in the line from the green stage and lower in the line from the red stage. In addition, the different cell lines show a different anthocyanin production capacity. Light induces the accumulation of anthocyanin mostly in the lines derived from the receptacle in the red stage and from leaf, while the increase in the ABA / auxin ratio mainly boosts the anthocyanin production in the line from green stage. The proliferation and pigment production capacities shown by the different lines are similar to those observed in the tissues of origin. This system of cell lines from receptacle at different developmental stages could be used as a model to achieve a genetic study that contributes to understanding the regulation of pigment accumulation in strawberry fruit during ripening.

5. The cell wall profile of the in vitro cultured fruit tissue is quite different from that of strawberry receptacles, showing a significant increase in the extensin epitope, independently of the development stage. However, some changes are detected in the pectin composition of the cell lines that resemble those observed during strawberry ripening, suggesting that it would be interesting to continue testing this system to be used as a model in studies of remodeling of the cell wall during strawberry ripening using other techniques.

# Summary of the thesis in English

The university requires for the international mention a summary of the thesis in another Spanish language of at least 5000 words.

## Chapter I: Introduction

The genus *Fragaria* (strawberry) contains 24 species. *Fragaria x ananassa* Duch. is a hybrid of *F. virginiana* and *F. chiloensis*, and one of the most cultivated species because of their large fruit size (Liston et al., 2014; Darrow, 1966). Strawberries are a very important crop economically, with Spain being one of the main exporting countries (FAOSTAT, 2020). In addition, strawberry consumption has been increasing over time, due to its organoleptic and nutritional properties (Skrovankova et al., 2015; Giampieri et al., 2012).

Strawberry is considered a non-climacteric fruit, so ethylene is not the main regulator of ripening (Given et al., 1988a). The regulated combination of the biosynthesis and action of 5 phytohormones (abscisic acid (ABA), auxin, gibberellin, cytokinins and ethylene) has been reported to control the fruit development and ripening process (Gu et al., 2019). ABA has been proposed as the main hormone promoting strawberry ripening, regulating pigment accumulation and fruit softening (Gu et al., 2019; Bustamante et al., 2006; Chai et al., 2011; Nardi et al., 2014). Auxin and gibberellin appear to play an antagonistic role for ABA, promoting cell expansion and division and delaying ripening processes such as pigment accumulation (Csukasi et al., 2011; Gu et al., 2019; Liao et al., 2018; Symons et al., 2012). Ethylene seems to also promote fruit ripening, activating cell wall degrading enzymes (Gu et al., 2019; Merchante et al., 2013; Sánchez-Sevilla et al., 2017; Sun et al., 2013; Villarreal et al., 2010, 2016). The role of cytokinins is not yet clear, but there are indications that it could play an important role in ripening (Kano and Asahira, 1979; Gu et al., 2019; Symons et al., 2012).

Strawberry is a soft fruit, and therefore has a short post-harvest life due to excessive softening of the fruit, making it unusable for the consumer and being susceptible to attack by pathogens (Giovannoni, 2001; Paniagua et al., 2017).

During ripening cell wall disassembly occurs, being one of the main causes of fruit softening and the increased susceptibility to pathogens (Mercado et al., 2011; Posé et al., 2019; Amil-Ruiz et al., 2011). So, understanding the mechanism and dynamics that the cell wall follows during ripening has become one of the current main challenges, to achieve more durable fruits without affecting other organoleptic properties (Wang et al., 2018).

The cell wall is mainly made up of 3 domains: one domain formed by a cellulose and hemicellulose network (approximately 50 % of the total weight of the cell wall), another domain formed by pectins (approximately 30 % of the total weight, although it is very variable) and a less dominant protein domain (Carpita and Gibeaut, 1993). Cellulose is considered the base of the primary cell wall due to its abundance (McCann et al.,



1990). Hemicellulose (mainly xyloglucans (XG)) is considered as interlocks of the cell wall, since it is closely linked to cellulose microfibrils (McCann et al., 1990). The pectin domain is made up of polymers rich in galacturonic acid, and can be highly branched (McCann et al., 2001). This domain of pectins is made up of 3 components: the homogalacturonan (HG), which is the more abundant; the highly branched rhamnogalacturonan I (RG-1) and rhamnogalacturonan II (RG-2), which is less well known due to its structural complexity and its lower proportion in the cell wall (Carpita and Gibeaut, 1993). Proteins linked to the cell wall are mainly composed of prolines and proteins rich in proline repeats (RPRP), and may have cell wall fixing functions (Chen and Varner, 1985; Cooper et al., 1987).

Although numerous studies have been conducted to understand the structure of the cell wall, it is not yet clear how the different components of the cell wall are linked to each other, or how these interactions influence the integrity of the cell wall. Carpita and Gibeaut, (1993) proposed the model of the three domains previously described in which each domain could be regulated independently depending on the state of cell development or environmental conditions. In this model, the cellulose-hemicellulose domain would play a major role in the cell wall structure, while pectins would have a minor role, related to the regulation of synthesis / degradation of the cellulose-hemicellulose domain. However, recently, Wang et al. (2018) proposed another model, in which pectins could play a more important role in the integrity of the cell wall, since components such as HG or RG-1 could be intimately linked to the cellulose-hemicellulose domain.

During strawberry ripening, the cell wall is modified by the sequential and coordinated action of different enzymes (Moya-León et al., 2019). The main changes produced are cleavages of polymeric main chains, elimination of side chains, elimination of methyl ester or acetyl groups from HG and the breakdown of hydrogen bonds between cellulose microfibrils (Paniagua et al., 2014). These changes produce a solubilization and / or depolymerization of pectins and a loss of neutral sugars from the branches (Figuroa et al., 2008). The solubilization of pectins leads to an increase in pectins extracted with water and with chelating agents such as CDTA, and a reduction in pectins covalently bound to the primary wall extracted with sodium carbonate (Posé et al., 2011).

The role of pectin depolymerization in cell wall disassembly during ripening is still unclear (Paniagua et al., 2017). One hypothesis is that the depolymerization of pectins by specific enzymes such as polygalacturonase (PG), pectin methyl esterase (PME), pectate lyase (PL) or rhamnogalacturonan lyase causes the increase of solubilized components and directly affects the texture of the fruit (Redgwell et al., 1997b; Rose et al., 1998; Vicente et al., 2007). Another hypothesis is that the change in the composition and structure of pectins modifies the access of degrading enzymes of cellulosic and hemicellulosic components of the cell wall (Nari et al., 1986; Baron-Epel et al., 1988; Redgwell et al., 1997a; Smith et al., 2002; Paniagua et al., 2016).

The correlation between the depolymerization of pectins and the loss of firmness in fruits has been widely discussed. There are studies in which there is no correlation between both processes (Huber, 1984; Redgwell et al., 1997a; Lee et al., 2011). However, Rosli et al. (2004) reported that the solubilization and depolymerization of

pectins it is more important in the softening of the fruit than the catabolism of cellulose or XG. Numerous studies have been carried out with transgenic lines of *F. x ananassa* where the expression of enzymes degrading pectins was altered, concluding that the solubilization of pectins reduces the firmness of the strawberry during ripening (Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Santiago-Doménech et al., 2008; Quesada et al., 2009; Posé et al., 2015; Paniagua et al., 2016). In the case of the role of ramnogalacturonano lyase in the loss of strawberry firmness during ripening, no functional studies have been carried out with transgenic lines, although there are hopeful studies in which its action is related to the softening of the fruit (Molina-Hidalgo et al., 2013; Méndez-Yañez et al., 2020).

The possible role of other cell wall components in strawberry softening has also been studied: Koh and Melton, (2002) found that the amount of cellulose was not altered during strawberry ripening; Nardi et al. (2014) reported a higher transcription of XG-degrading enzymes in strawberry varieties with firmer fruits; The study of expansins during strawberry ripening seems to indicate that there are different isoforms and that each one could exert a different function (Figuroa et al., 2009; Valenzuela-Riffo et al., 2019).

For all these reasons, it seems that pectins play a fundamental role in maintaining the firm texture of strawberry fruits. Furthermore, there are enough signs to think that RG-1 plays a key role in maintaining the structure of the middle lamella and, therefore, in cell adhesion.

Transcription factors (TFs) are proteins that bind specifically in regulatory regions of DNA, modulating gene transcription. These proteins are grouped into families, based on conserved domains that usually have a DNA binding function (Jinpu Jin et al., 2017; Luscombe and Thornton, 2002). TFs, in addition to those domains conserved between families, have highly variable domains that usually give specificity of action, being able to bind to RNA polymerase, other transcription factors or histones (Fietze and Farnham, 2011).

The role of TFs in strawberry ripening is still poorly understood. This is because it is difficult to study the function of a TF since they can form complex interaction networks with other TFs, affecting numerous processes (Moya-León et al., 2019). On the other hand, the similarity of sequences in the same TFs family does not imply that they are involved in the regulation of the same metabolic processes (Klie et al., 2014).

However, several studies have already been carried out that show the involvement of different TFs in various aspects of the strawberry ripening process. One of the most characterized TF is the R2R3-MYB FaMYB10, whose expression is located mainly in the strawberry receptacle, increasing at the white stage of ripening, and positively regulated by ABA and by light, independently. *FaMYB10* is a key gene responsible for the red color since it activates the synthesis of anthocyanins through the flavonoid/phenylpropanoid pathway (Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Hawkins et al., 2016; Zhang et al., 2017). Other R2R3-MYB TFs that have been characterized in strawberry and that are related to ripening are FaMYB1, FaMYB9, FaMYB11, FaMYB44.2, FaGAMYB and FaEOBII (Schaart et al., 2013;

Salvatierra et al., 2013; Lin-Wang et al., 2014; Vallarino et al., 2015; Medina-Puche et al., 2016; Wei et al., 2018).

It has also been characterized a MADS-box type gene, *FaMADS9*, an orthologue of the tomato RIN, whose expression is necessary for the correct development and ripening of the strawberry fruit (Seymour et al., 2011; Vallarino et al., 2019). An opposed role seems to exert *FaMADS1a* whose expression decreases with ABA and increases with auxin, causing the repression of genes related to the synthesis of anthocyanins (Lu et al., 2018). Another gene of this MADS-box family characterized is *FaSHP*, belonging to type c of this gene family (SHATTERPROOF type) that controls fruit ripening, and auxin and ABA antagonistically affect its expression (Daminato et al., 2013).

The NAC TF family has been related to multiple processes in plants, although the possible role that they play in strawberry ripening is still limited (Moya-León et al., 2019). Carrasco-Orellana et al. (2018) provided evidence that *FcNAC1* in *F. chiloensis* could play an important role in the regulation of cell wall degrading genes during strawberry ripening, while Moyano et al. (2018) proposed six NAC TF in *F. x ananassa* as candidates to regulate strawberry ripening, since they showed an expression pattern related to fruit ripening, suggesting an important role in this process. However, none of these TFs have been characterized by stable transgenic lines.

Studying processes related to the ripening of the fruit with material from the greenhouse has several drawbacks: one of them is the fact that the ripening of the strawberry is a process regulated not only by internal factors (such as transcription factors) but also by external factors (such as seasonality) (Giovannoni, 2001); another drawback is that the strawberry fruit is a complex organ that contains different tissues that have different metabolisms during ripening. The use of cell cultures, having a faster growth than in the field and not being affected by external factors, allows us to carry out experiments in shorter periods of time and throughout the year, facilitating work planning (Sharathchandra et al., 2011). It also allows us the possibility of precisely controlling most of the environmental factors (light, temperature, nutrients, humidity...). Another important aspect is that the individual isolation of the material avoids the attack of pathogens or facilitates control in the event that it occurs, which together with its ease of handling and space and cost savings, make cell lines a powerful tool for metabolic studies (Ramachandra-Rao and Ravishankar, 2002).

In other species such as grapevine, cell cultures have been used to check the response against pathogens (Mutawila et al., 2017), analyze the effect of secondary metabolites and darkness on cell death and senescence (Bertolini et al., 2016), check the effect of compounds such as methyl jasmonate on secondary metabolism (Andi et al., 2019), analyze the extracellular proteome (Sabater-Jara et al., 2014) or study the changes in the cell wall as a consequence nutrient deficiency (Fernandes et al., 2013). In strawberry, cell lines have also been used to study certain processes such as phenol metabolism and its relationship to growth (Arnaldos et al., 2001; López-Arnaldos et al., 2002) and anthocyanin synthesis (Mori et al., 1994; Sakurai and Mori, 1996; Zhang et al., 1998). However, cell lines from strawberry fruits at different stages of ripening have not been obtained to verify the validity of this system in the study of processes related to ripening, such as cell wall degradation or hormonal regulation of anthocyanin biosynthesis.

## Aims

1 – To obtain transgenic lines of *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' with a down-regulated *FaNAC2* gene, and transgenic lines with a down-regulated *FaNAC3* gene, as well as characterization the fruits produced by these lines evaluating their roles in fruit development and ripening, including their function in the cell wall.

2 – To characterize fruits of transgenic lines of *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' with a down-regulated *FaRGlyase 1* gene, and to analyze its effect on the structure of the cell wall and on the softening of the fruit during ripening.

3 – To characterize cell lines from the receptacle of *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' at different stages of ripening, as well as leaf, to explore their use as a model system to study color development and cell wall remodeling during strawberry fruit ripening.



## Chapter II: Characterization of the *FaNAC2* and *FaNAC3* genes in fruits of *F. x ananassa* Duch. 'Chandler'

### Introduction

It has been reported that TFs can modulate numerous metabolic pathways, being able to affect the biosynthesis and signaling of different hormones, and therefore being regulatory elements of strawberry development and ripening (Salvatierra et al., 2013; Schaart et al., 2013; Vallarino et al., 2015; Molina-Hidalgo et al., 2017; Lu et al., 2018). The NAC TF family is a group of proteins that have a conserved NAC domain of approximately 150 amino acids at the N-terminus and a more variable region at the C-terminus (Ernst et al., 2004). The involvement of NAC TFs in processes such as abiotic stress due to drought, freezing or salinity (Shao et al., 2015), root formation (He et al., 2005), flowering (Sablowski and Meyerowitz, 1998), senescence (Kim et al., 2016) or defense against pathogens has been documented (Hai-Yun Wang et al., 2009; Nuruzzaman et al., 2013; Yuan et al., 2019).

NAC TFs are also involved in the ripening process, both for climacteric and non-climacteric fruits. Two NAC genes isolated from banana fruit (*MaNAC1* and *MaNAC2*) seem to be involved in fruit ripening, by interacting with an EIN3 homologous repressor of the ethylene signaling pathway (Shan et al., 2012). In peach, the heterodimer formed by two NAC TFs (BL-PpNAC1) has been shown to promote anthocyanin biosynthesis inducing *PpMYB10* gene expression (Zhou et al., 2015). In melon, species whose ripening behaviour resembles that of the climacteric model, a repression of the *CmNAC-NOR* gene, similar to that of tomato, caused a delay in ripening together with a reduction in ethylene biosynthesis, while in species whose ripening seems being non-climacteric seems to cause the climacteric recovery (Ríos et al., 2017). In papaya, there are two NAC TFs involved in carotenoid biosynthesis, CpNAC1 that promotes the transcription of phytoene desaturase genes, and CpNAC2 that appears to bind CpEIN3a and activate a subset of genes related to carotenoid biosynthesis (Fu et al., 2016, 2017). In kiwi, the exogenous application of methyl jasmonate and ethylene seems to induce the biosynthesis of ethylene through the action of AdNAC2 and AdNAC3 (Wu et al., 2020). In apple fruit, MdNAC42 TF has been shown to promote anthocyanin biosynthesis via the phenylpropanoids by interacting with MdMYB10 (Shuangyi Zhang et al., 2020). In tomato, it has been verified that *SINAC1* gene expression causes a reduction in the accumulation of ethylene, decreasing the accumulation of carotenoids and delaying ripening, and an increase in ABA levels accompanied by excessive softening (Ma et al., 2014; Meng et al., 2016). However, the expression of the *SINAC4* gene seems to promote tomato ripening, since down-regulation of *SINAC4* resulted in delayed ripening by reducing the synthesis of ethylene and the accumulation of carotenoids (Zhu et al., 2014; Rufang Wang et al., 2019). Two other genes that could promote tomato ripening are *SINAC48* and *SINAC19*, which seem to act upstream of the genes responsible for ethylene biosynthesis (Kou et al., 2016). In addition, the repression of *NAC-NOR* and *NAC-NOR-like1*, cause a delay in ripening affecting genes related to the production of anthocyanins (Gao et al., 2018, 2020). In lychee, considered as non-climacteric fruit, it seems that LcNAC1 acts antagonistically to LcWRKY1 TF, delaying senescence through the action of LcAOX1a, a protein that prevents the accumulation of oxidizing molecules during senescence of

the fruit (Jiang et al., 2017). Furthermore, it appears that anthocyanin biosynthesis during ripening is controlled by the antagonistic action of LcNAC13 and LcMYB1, with LcNAC13 being a negative regulator (Jiang et al., 2019). In tangerine fruit, also considered non-climacteric, CrNAC036 has been shown that can bind CrMYB68 to suppress synergistically ABA biosynthesis by repressing the expression of *CrNCED5* (Zhu et al., 2020).

In strawberry, the role of NAC TFs is very scarced. Carrasco-Orellana et al. (2018) characterized a ripening related *FcNAC1* gene, which encodes a nuclear TF that is induced by ABA and repressed by auxin, affecting the expression of cell wall modifying enzymes, color development and the formation of aroma components. Moyano et al. (2018) identified 112 genes coding for NAC-type TFs, of which *FaNAC006*, *FaNAC021*, *FaNAC022*, *FaNAC035*, *FaNAC042* and *FaNAC092* were up-regulated during the development and ripening of the strawberry, suggesting a possible role in ripening. Also, it was demonstrated that all except for *FaNAC092*, were induced by ABA, further supporting their possible role in strawberry fruit ripening.

This work aims to achieve transgenic lines of *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' with the *FaNAC035* gene (FvH4\_3g20700.1 in version 4.0.a1 of the *F. vesca* genome, in the *Rosaceae* database), named in this thesis as *FaNAC2*, and *FaNAC042* (FvH4\_4g23130.1 in version 4.0. a1 of the *F. vesca* genome, in the *Rosaceae* database), named as *FaNAC3*, down-regulated by RNAi (using *Agrobacterium tumefaciens* as vector). In addition, make a functional and transcriptomic analysis of the fruits produced by the previous lines.

## Results and Discussion

Fruits from *F. x ananassa* Duch. 'Chandler' plants with a down-regulated *FaNAC2* gene (FaNAC2 fruits) and a down-regulated *FaNAC3* gene (FaNAC3 fruits) were characterized. Non-transgenic fruits were used as a control. For FaNAC2 fruits, 3 lines were analyzed, while 2 were the FaNAC3 lines used for the study. At least 75 % downregulation of their respective gene expression was shown in all the transgenic lines analyzed. To characterize the transgenic fruits, weight, length, width, color, firmness and soluble solids were quantified. The development of the fruits was also monitored to compare the ripening evolution. In addition, a cell wall analysis was done. On the other hand, a transcriptomic analysis was performed with the fruits of one line of each transformation (FaNAC2 11 and FaNAC3 3) and the control line.

### - **Influence of FaNAC2 and FaNAC3 on fruit size**

A reduction in fruit size was produced in all the transgenic lines, both FaNAC2 and FaNAC3, showing a reduction in weight and length of the width and length of the fruit. In the fruits of both TFs, alterations in the expression of numerous genes were detected which could be the cause of this very diverse reduction in size. It is widely accepted that auxin plays a fundamental role in the early cell division of fruits being the determining factor for fruit size (Pandolfini et al., 2007; Ruan et al., 2012; Pattison et

al., 2014; Liu et al., 2018). Genes related to the synthesis of tryptophan, a precursor to auxin, and the signaling pathway for this hormone was repressed in the FaNAC2 11 line. Auxin signaling effector proteins, such as SAUR and AUX / IAA proteins were also repressed. A reduction in auxin synthesis in its signaling pathway could be the cause of the reduction in size of transgenic fruits with *FaNAC2* gene down-regulated. In the case of the fruits of the FaNAC3 3 line, there was no clear trend regarding alterations in biosynthesis and auxin signaling. So, it seems that the reduction in size cannot be explained by the action of this hormone in this line.

Gibberellin is a hormone related to the cellular expansion of fruits (Csukasi et al., 2011). The amount of gibberellins in their active form ( $GA_4$ ) could be affected in both transgenic lines. For FaNAC2 11, a repression of the *FaGA3ox* gene, coding for the enzyme gibberellin 3- $\beta$ -dioxxygenase, responsible for the biosynthesis of  $GA_4$  was detected (Lemaire-Chamley et al., 2005; Csukasi et al., 2011). The fruits of this line also showed an increase in the expression of a gene that encodes a gibberellin 2- $\beta$ -dioxxygenase (*GA2ox*) responsible for the catabolism of the active form  $GA_4$  (Csukasi et al., 2011). Furthermore, in fruits of the FaNAC2 11 line, a high repression of a gene coding of the DELLA-type repressor in the gibberellin signaling pathway was recorded. In the case of the fruits of the FaNAC3 3 line, the signaling pathway of the gibberellins did not show significant alterations in gene expression. However, an up-regulation of 3 genes encoding *GA2ox* enzymes was recorded. Controlling gibberellin levels actively could cause fruit size reduction in both FaNAC.

The possibility that NAC TFs may intervene in the auxin-mediated response has been previously reported in *Arabidopsis* and tomato fruit (Xie et al., 2000; Kou et al., 2016). There are also works that relate these TF with the regulation of gibberellins, controlling the expression of the *GA2ox* enzyme (Chen et al., 2019) or interacting with DELLA proteins (Huang et al., 2015). To our knowledge, a possible regulation of the gibberellin-mediated pathway through NAC TF has not been described yet. Our results open a possible avenue for future research suggesting a possible control of FaNAC2 and FaNAC3 at the levels of the active form  $GA_4$  by repressing the expression of the catabolic enzyme *GA2ox*, and in the case of FaNAC2 also activating the transcription of the biosynthesizing enzyme *GA3ox*.

**- Possible role of FaNAC2 and FaNAC3 in the accumulation of pigments and soluble solids in strawberry fruit during ripening**

FaNAC2 11 and FaNAC2 12 line fruits showed a delay and an irregular and incomplete ripening, with the pigments accumulating mainly in the apical zone, leaving the basal area white. This irregular ripening pattern is shown in fruits of both FaNAC2 lines cut longitudinally since, despite showing signs of overripening, the pith of the transgenic fruits were whitish. For FaNAC3 line fruits a homogeneous pigmentation was observed, being all the color variables analyzed higher than in control fruits in the case of FaNAC3 3 and similar to the control fruits in the case of FaNAC3 10.

The main strawberry pigments that give the characteristic red color to ripen fruits are anthocyanins (Bakker et al., 1994). The biosynthesis of these pigments mainly depends on the general phenylpropanoid and flavonoid pathways (Almeida et al., 2007;

Fait et al., 2008; Griesser et al., 2008). The fruits of the FaNAC2 11 line showed alterations in gene expression of these biosynthetic pathways, being the most important changes a down-regulation of two genes that encode a naringenin 2-oxoglutarate 3-dioxygenase in the flavonoid pathway and an anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2 in the anthocyanin biosynthetic pathway. However, the fruits analyzed from the FaNAC3 3 line showed no alteration in the expression of any of these genes, although a slight up-regulation of two genes encoding enzymes of the 4-coumarate family: CoA ligase that act downstream of the PAL in the phenylpropanoid pathway was found (Hu et al., 1998). These results suggest that FaNAC2 could be involved in the pigmentation increase of strawberry fruit during ripening, activating key enzymes in the biosynthetic pathways of phenylpropanoids, flavonoids and anthocyanins, while FaNAC3 could be a repressor of several enzymes of the 4-coumarate family: CoA ligase whose down-regulation caused an increase in color in fruits of the FaNAC3 3 line. However, fruits of the FaNAC3 3 and FaNAC3 10 line did not match in the trend with respect to the color of control fruits. So it is necessary to perform expression studies of this gene by qPCR in different down-regulated *FaNAC3* lines and to rule out that this change in expression has been produced by the process of genetic transformation and not by the absence of *FaNAC3* transcripts. Our results point in the same direction as those described by Fu et al. (2016), where the papaya TF CpNAC1 seems to regulate ripening by activating the transcription of carotenoid biosynthetic enzymes. The possibility that TF NAC regulate pigmentation during ripening through the anthocyanin biosynthetic pathway has also been described in tomato and lychee fruit (Gao et al., 2018; Jiang et al., 2019; Gao et al. , 2020).

Using a protein interaction assay with both FaNAC against a library of genes from *F. vesca* in yeast, the most interesting positive result was a possible interaction between FaNAC2 and FaMYB10. FaMYB10 is a TF that plays a key role in the production of anthocyanins by regulating the expression of enzymes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways (Medina-Puche et al., 2014; Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Hawkins et al. al., 2016; Zhang et al., 2017; Hua Wang et al., 2019). Down-regulation of *FaMYB10* in strawberry fruit caused the repression of genes codifying for PAL and anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, similar to that caused in fruits of the FaNAC2 line 11. In addition, a reduced production of the flavonoid naringenin was observed in *FaMYB10* down-regulated fruits (Medina-Puche et al., 2014). These coincidences suggest that both TFs could act synergistically, interacting physically to promote the production of anthocyanin pigments in strawberry fruit during ripening, activating key enzymes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. Furthermore, FaNAC2 11 line fruits showed a 52 % repression of *FaMYB10*. This opens up the possibility of another form of action of FaNAC2 on FaMYB10, binding to its promoter and activating its transcription, thereby causing the production of pigments in strawberry fruit during ripening. Both possibilities have already been reported within MYB TF family described above-mentioned (Molina-Hidalgo et al., 2017; Ye et al., 2018). Thus, it would be interesting to continue studying these possibilities by test of physical interaction through the double hybrid in yeast, FaNAC2 against FaMYB10 and of FaNAC2 against *FaMYB10* promoter.

Down-regulated *FaNAC3* gene lines produce fruits with homogenous pigmentation during ripening. However, the two transgenic lines analyzed did not present the same

amount of color in the analyzed variables, being these values higher in fruits of the FaNAC3 line 3 than in control fruits, while the fruits of the FaNAC3 10 line did not show significant differences. Furthermore, FaNAC3 3 line fruits did not show gene down-regulation of key enzymes in the biosynthesis of anthocyanins via the phenylpropanoid and flavonoid pathways, but showed up-regulation of 2 enzymes of the phenylpropanoid pathway that could explain the increase of the color. In addition, FaNAC3 does not appear to show interaction with FaMYB10, and there could explain the difference observed in the ripening pattern with respect to the fruits with down-regulated *FaNAC2*. These results are in line with those described in pear where TF PpNAC1 seems to regulate ripening through the activation of TF PpMYB10.1 (Zhou et al., 2015), and with those described in apple fruit where the TF MdNAC42 promotes the biosynthesis of anthocyanins through the phenylpropanoid pathway interacting with MdMYB10 (Shuangyi Zhang et al., 2020).

Another factor considered determining in the ripening of strawberry fruit is the increase in ABA levels, which is assumed, among others, to play a role in inducing genes encoding cell wall degrading enzymes for disassembly, and enzymes of the synthesis of anthocyanins (Jia et al., 2011, 2016; Medina-Puche et al., 2016). One of the enzymes in charge of synthesizing ABA is 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) (Schwartz et al., 1997). The FaNAC2 11 line showed alterations in the carotenoid biosynthetic pathway, with down-regulation of two genes encoding NCED enzymes (*NCED1* and *NCED2*), down-regulation of 3 genes encoding abscisic acid 8 'hydroxylase and up-regulation of another enzyme in this family. The FaNAC3 3 line showed a very slight down-regulation of the gene encoding *NCED2* ( $\log_2$  fold change -0,6) and a high up-regulation of a gene encoding an abscisic acid 8 'hydroxylase ( $\log_2$  fold change 6). In strawberry it has been shown that the down-regulation of *NCED* causes a delay in ripening (Jia et al., 2011). In addition, it has been proven that the function of the enzymes abscisic acid 8 'hydroxylase is to inactivate ABA, having an antagonistic role to NCED (Liao et al., 2018). The results of the transcriptomic analysis support the anomalous ripening pattern observed in fruits of the FaNAC2 lines and the homogeneous ripening presented by the fruits of the FaNAC3 lines. Similar results were obtained by Medina Puche et al. (2014) by down-regulation *NCED1*. Furthermore, they found that the reduction of ABA in fruit by down-regulation of *NCED1* caused a repression of *FaMYB10*. These results suggest that the role of FaNAC2 on ripening control could be the activation of *FaNCED1* which could subsequently trigger the expression of *FaMYB10* and, therefore, the anthocyanin production, instead of activating *FaMYB10* by binding to its promoter (Figure 2.25). These results are supported by the findings in tangerine fruit, considered non-climacteric, where CrNAC036 can bind CrMYB68 to control ABA biosynthesis through the expression of *CrNCED5* (Zhu et al., 2020). To clarify these hypotheses, it would be necessary to carry out a physical interaction test between FaNAC2 and the *FaNCED1* promoter together with the 2 experiments previously proposed in this section (promoter of *FaMYB10* and *FaMYB10*).

In several studies, ABA has also been related to the increase in fruit sugar content, being carbohydrates activators of action of ABA, which would induce gene expression of genes encoding cell wall degrading enzymes and the synthesis of anthocyanins (Jia et al., 2013, 2016; Palma et al., 2019). Jia et al. (2013) demonstrated that sugar is

involved in the activation of ABA signaling, specifically in the increase of *NCED* transcription (ABA biosynthesis) and studied the effect of sucrose synthesized in strawberry fruit and transported from the leaves. Furthermore, they found that FaSUT sucrose transporters, especially FaSUT1, play a fundamental role in increasing sucrose in the fruit during ripening, and in increasing ABA biosynthesis by activating *NCED* expression.

Our results obtained with the fruits of the FaNAC2 11 and FaNAC3 3 lines could support the role of sucrose in the ripening process. These fruits did not show significant differences in the amount of soluble solids, showed a down-regulation of genes encoding *NCED* enzymes (in the case of FaNAC3 slightly), and showed no alteration in the transcription of the sucrose transporter FaSUT1, suggesting that both TFs would act after the increase of sucrose in the fruit. A possible route of action would be that the sucrose is transported from the leaves to the fruits, increasing its concentration; this sucrose would activate both NAC TFs, which would then activate *NCED* enzyme transcription and finally, *NCED* would increase the biosynthesis of ABA, which would regulate the expression of ripening-related genes. Another plausible option is that in this hypothetical cascade, sucrose activates *FaNAC2*, and *FaNAC2* activates *FaNAC3*, which would contribute to increase *NCED2* transcription. This latter possibility is reinforced by the fact that *FaNAC3* was shown to be down-regulated in fruits with *FaNAC2* RNAi, suggesting a possible control of *FaNAC3* by *FaNAC2* in some metabolic pathways. Furthermore, both FaNAC TFs showed a similar expression pattern during ripening process, increasing in ripen stages when the sucrose content is high (Moyano et al., 2018). However, in the anthocyanin biosynthetic pathway, the down-regulation of *FaNAC2* showed repression of key genes, while that of *FaNAC3* did not, suggesting that in some processes *FaNAC2* controls *FaNAC3*, but in other processes they would act independently.

#### - Influence of FaNAC2 and FaNAC3 on the composition of the cell wall

The cell wall analysis of FaNAC2 and FaNAC3 fruits showed changes in the composition with respect to control fruits. These changes in the cell wall probably caused the increase in firmness of the FaNAC2 fruits. However, FaNAC3 fruits did not show significant differences with respect to the control.

As strawberry fruit ripening progresses, the expression of hydrolytic enzymes of the cell wall changes, leading to its disassembly, and decreasing its firmness (Brummell, 2006; Posé et al., 2019). The regulation of these enzymes has been shown to be under the action of phytohormones, with TFs modulating hormone levels during development that indirectly affect cell wall disassembly (Moya-León et al., 2019). The numerous alterations in the gene expression of the biosynthesis and signaling of hormones registered in the fruits of the FaNAC2 11 and FaNAC3 3 lines probably contributed to the alterations observed in the cell wall.

FaNAC2 11 line showed a reduction in the expression of 2 genes that encode endo- $\beta$ -1,4-glucanase enzymes, 3 genes that encode  $\beta$ -galactosidase enzymes and 1 that expresses a PME, while there was an increase in expression of 1 gene encoding a cellulose synthase, another expressing another endo- $\beta$ -1,4-glucanase, 11 encoding

XTH enzymes, 1 encoding a  $\beta$ -D xylosidase, another expressing arabinofuranosidase, 3 genes encoding PME, 1 of PL, 1 of expansin, 4 encoders of *plasmodesmata callose-binding protein* (PDCB) and 2 that express AGP type FASCICLIN. Regarding the amount of pectins, the most notable change in this line was an increase in the amount of HG in the soluble fraction and in the fraction retained by ionic bonds to the primary cell wall (water and CDTA), especially in HG with a low degree of demethylation. However, in the fractions strongly retained to the primary wall (carbonate and KOH) the FaNAC2 11 line showed similar or somewhat lower HG values with respect to the control fruits. The amount of low methylation HG was again higher in the FaNAC2 line 11 after cellulase treatment, indicating a possible retention of HG in the primary wall. Regarding the amount of RG-1 backbone, the fruits of the FaNAC2 11 line showed similar values in the soluble and weakly retained fractions with respect to the control fruits, while in the strongly bound pectin-enriched fractions they showed a reduction. These results could be explained by the up-regulation of 2 PME ( $\log_2$  fold change of 5.1 and 3.4) that could be involved in the high amount of HG with a low degree of esterification shown by this line. The demethylation of HG is essential for the action of other depolymerizing enzymes such as PG or PL, since these enzymes act on HG with low methylations (Draye and Van Cutsem, 2008). High demethylation could facilitate the action of pectinases, which accompanied by up-regulation of a PL would cause a reduction in the amount of pectins. Another option, although it may be related, it is the low amount shown by the fruits of the FaNAC2 11 line in the number of branches of arabinan, being able to facilitate the action of RG lyase enzymes (Oomen et al., 2002). This reduction in the amount of arabinan could have been favored by the up-regulation of an arabinofuranosidase. However, the down-regulation of 3 genes coding for  $\beta$ -galactosidases could cause the tendency shown by the galactan branches to be contrary, showing a greater signal in the fruits of the FaNAC2 11 line than in the control fruits in all the fractions, except of carbonate.

A higher amount of cellulosic-hemicellulosic component could be retaining and hiding the actual amount of pectins in the carbonate and KOH fractions, and the RG-1 values may be even higher than those shown. This hypothesis arises from the fact that in the 4 M carbonate and KOH fraction, the FaNAC2 11 line shows lower RG-1 values than the control line, however, when treating with cellulase, the amount of RG-1 is higher. This hypothesis is reinforced by the fact that fruits of the FaNAC2 11 line showed an up-regulation of a gene related to cellulose synthesis (cellulose synthase) and a down-regulation of 2 genes encoding cellulose-depolymerizing enzymes of the endo- $\beta$ -1 type, 4-glucanase ( $\log_2$  fold change -5.9). In 4 M KOH fractions separated by anion exchange chromatography, the RG-1 signal in the FaNAC2 11 line shows a similar (and even slightly higher) value than the control line, whereas before being passed through the anion exchange column, the control line clearly has a higher signal. This is applicable for the signals shown by the RG-1 ramifications, suggesting that the signals may be hidden in the carbonate and KOH fractions by other components, such as cellulose, as a consequence of an increase in their synthesis and a reduction in its depolymerization. Furthermore, this is reinforced by the fact that despite of up-regulation of 11 genes coding for XTH enzymes in the FaNAC2 line 11, it did not translate into a signal reduction.

*FaNAC3* down-regulation also caused changes in gene expression of numerous cell wall related enzymes. Among the most outstanding, we found down-regulation of 3 genes encoding expansins and up-regulation of 3 genes encoding cellulose synthase, 1 expressing an endo- $\beta$ -1,4-glucanase, 4 genes encoding polygalacturonases and 1 expressing an PDCB. In addition, there were numerous families of genes that were affected differently as genes encoding  $\beta$ -galactosidases that showed 1 gene down-regulated and another up-regulated; genes coding for PME, 3 being those that showed a reduced expression and 2 with an increase in their expression; also XTH coding genes showed 1 down-regulation and 2 up-regulations; 1 gene encoding AGP of FASCICLIN type was down-regulated, and another up-regulated.

However, in fruits of the *FaNAC3* lines the differences shown in the ELISA analysis were less important. Only a clear increase in RG-1 ramifications in the form of galactans (detected by the LM26 antibody) in the 4 M KOH fraction was obtained. This increase was also confirmed after separation by anion exchange chromatography. *FaNAC3* 3 line did not show large signal differences when 4 M KOH fraction was treated with cellulase, which suggests that it probably did not have as much of this component as that mentioned for the fruits of *FaNAC2* lines.

The most important changes shown in the cell wall analysis, apart from those discussed in the amount of cellulose in the fruits of the *FaNAC2* lines, were in the components of callose and AGP. Callose is a polymer that has been linked as a defense against pathogens as a cell wall fortification mechanism to prevent invasion (Aist, 1976; Kwon et al., 2008; Amil Ruiz et al., 2011; Luna et al., 2011). Down-regulation of *FaNAC2* caused an increase in the amount of callose in the 4 M KOH fraction, being corroborated after separation by an anion exchange column, indicating an increase in neutral components (callose). These results are supported by the transcriptomic analysis of the *FaNAC2* 11 line fruits, where there is an up-regulation of 4 genes encoding probable PDCB, proteins with an important role in the deposition of callose in the cell wall (Simpson et al., 2009). In the case of *FaNAC3*, its down-regulation did not cause changes in the signal emitted by callose, although it did cause an increase in the transcription of 1 probable PDCB. Up-regulation of fewer PDCB proteins could be the cause of not increasing the level of callose in the *FaNAC3* RNAi lines.

A possible cause of this increase in callose deposition by the *FaNAC2* 11 line may be due to an up-regulation of two genes encoding the linolate 9S lipoxygenase (9LOX) enzymes, being in one of them very marked up-regulation ( $\log_2$  fold change 3,8). In *Arabidopsis*, Marcos et al. (2015) verified that the products of the enzyme 9LOX, called oxilipines, act as signaling molecules that activate the brassinosteroids pathway through ROS molecules after the attack of a pathogen. This signaling route involves fortification of the cell wall with an increase in lignin and callose. This hypothesis is reinforced by the fact that the fruits of the *FaNAC2* line showed a tendency to overexpress genes related to the biosynthesis of brassinosteroids and their signaling pathway. In addition, this is supported by the results obtained with the fruits of the *FaNAC3* 3 line, where the amount of callose was not changed and 3 genes encoding 9LOX enzymes were repressed slightly. In addition, genes related to the brassinosteroids signaling pathway did not show important alterations.

The role of brassinosteroids in the response to pathogens in strawberry fruit is quite unknown. There is only one published work carried out in strawberry, with in vitro leaves, where the application of brassinosteroids increased the deposition of callose and lignin, causing an increase in ROS and NO, probably as signaling molecules that activate the plant's immune system, resulting in leaves more resistance against the *Colletotricum acutatum* fungus (Furio et al., 2019). These alterations, both in the cell wall and in the signaling molecules, are similar to those detected in this work, suggesting that one of the key roles of FaNAC2 is to repress the response of brassinosteroids by repressing the transcription of enzymes 9LOX. The repressive role of FaNAC2 in 9LOX enzyme transcription could be the key to a brassinosteroids mediated response to pathogens, including cell wall fortification with increased callose deposition. This, together with the non-participation of FaNAC3 in the synthesis of oxilipinas, and therefore, in the response caused by brassinosteroids, can make the difference in the firmness shown by the FaNAC2 and FaNAC3 lines, caused by differences in the callose deposition.

AGP are plant glycoproteins with a central protein to which one or more carbohydrates are attached (mainly galactans and arabinans). Another characteristic is that these arabinogalactans often have a glycosyl phosphatidyl inositol lipid attachment, which seems to be important in their function (Seifert and Roberts, 2007). These AGPs, due to their ability to anchor themselves to the plasma membrane, the cell wall, and their protein nature, have been associated with numerous processes in the plant, including the response against microorganisms. Nevertheless this role is not clear, being able affect cellulose synthesis, callose deposition and the action of pectate lyase, exerting an important role in communication between cell wall metabolism and intracellular signals (Schulze-Lefert, 2004; Somerville et al., 2004; Seifert and Roberts, 2007; Jamet et al., 2008).

When *FaNAC2* was down-regulated, there was a reduction in the signal emitted by AGP-specific antibody JIM 13, in the water, CDTA and carbonate fractions. However, there was an increase in the fractions extracted from the primary wall (4 M KOH and cellulose), indicating once again that the changes in cellulose could be one of the main changes shown by the FaNAC2 lines. The FaNAC2 11 line showed an up-regulation of two genes coding for FASCICLIN proteins ( $\log_2$  fold change 2.2 and 1.6). These proteins are a subclass of AGP (Gaspar et al., 2001; Haihai Wang et al., 2015), and normally have a glycosyl phosphatidyl inositol linker, which could connect to the plasma membrane, making them candidates for perceiving and transmitting signals from the inside the cell to the cell wall, and vice versa. Furthermore, this subfamily appears to be involved in cell wall biosynthesis, signaling, and remodeling (Ellis et al., 2010). Down-regulation of *FaNAC3* caused an increase in AGP signal in line 3 in the carbonate fraction, but not in the rest of the fractions, showing a similar value as the control line. Line 10 did show a general increase in AGP signal in all fractions. Transcriptomic analysis of line 3 revealed an increase and decrease in the expression of a gene encoding a FASCICLIN AGP ( $\log_2$  fold change 1.8 and -2.6).

The up-regulation of 2 possible FASCICLIN in fruits with down-regulation of *FaNAC2*, or the repression of 1 AGP FASCICLIN in the FaNAC3 line 3 fruits, could be key in the differences shown in the cell wall of both transgenic lines. AGP could cause an



increase in cellulose synthesis and in the deposition of callose, a profile shown only by the fruits of the FaNAC2 lines. This increase in cellulose, together with the increase in callose, could be the causes of the increase in firmness in the fruit (Eskin, 2012; Liu et al., 2019), explaining that the down-regulation of *FaNAC2* caused significantly firmer fruits than the control fruits, and that this increase in firmness was not observed with the down-regulation of *FaNAC3*.

## Chapter III: Characterization of the *FaRGlyase 1* gene in fruits of *F. x ananassa* Duch. ‘Chandler’

### Introduction

During strawberry ripening, a solubilization of pectins occurs, which results in an increase of the pectins solubilized and bound by ionic bonds, extracted with water and with chelating agents such as CDTA, respectively, (Huber, 1984; Koh and Melton, 2002) and a decrease in covalently bound pectins, extracted with sodium carbonate (Posé et al., 2011). The solubilization and depolymerization of pectins is accompanied by the loss of neutral sugars from the RG-1 side chains (Figueroa et al., 2008).

The RG-1 is formed by a vertebral column of alternating units of rhamnose and galacturonic acid, linked by  $\alpha$  1,2 and  $\alpha$  1,4 bonds, that is, disaccharides [ $\rightarrow$  2) - $\alpha$ -l-Ramp- (1  $\rightarrow$  4) - $\alpha$ -D-AGalp- (1  $\rightarrow$ ] (Lau et al., 1985; McNeil et al., 1980; Voragen et al., 2008). AGalp residues may be acetylated at positions O-2 and / or O-3, the degree of acetylation being different depending on the tissue. In addition, Ramp residues may contain ramifications in the O-4 and / or O-3 position (Silva et al., 2016).

The side chains are usually composed of neutral sugars, consisting mainly of  $\beta$ -D-galactopyranosyl and / or  $\alpha$ -D-arabinofuranosyl. The complexity of RG-1 is due the variable sizes of these side chains, ranging from a single unit to polymers with 50 units or more: arabinan, galactoarabinan, galactan and different types of arabinogalactan (Lerouge et al., 1993). Arabinogalactans can be associated with proteins called arabinogalactan proteins, and arabinans can connect to each other in practically all free positions, O-2, O-3, and O-5, forming a very diverse group of branches (Carpita and Gibeaut, 1993). This complexity in the branches is responsible for the chemical and structural complexity of the pectins since RG-1 can represent up to 35% of the total mass of the pectins (Mohnen, 2008).

There are different enzymes that degrade RG-1 and can be classified according to their action. Firstly, if they catalyze the cleavage by hydrolysis (hydrolases) or by  $\beta$  elimination of the  $\alpha$  bond (1  $\rightarrow$  4) (liases) between disaccharides; and secondly, depending on their action pattern, they can be “endo” when cutting randomly at non-terminal points, and “exo” when cutting extremely terminally (Sakai et al., 1993). At least 23 enzymes that attack the RG-1 backbone in fungi have been characterized, 11 are hydrolases and 12 are lyases (Lombard et al., 2014), however, the role of these enzymes in the loss of fruit firmness during ripening is still poorly understood.

In strawberry, Molina-Hidalgo et al. (2013) characterized a rhamnogalacturonan lyase in *F. x ananassa* that increased its expression during fruit ripening, and was also receptacle specific. Also, they found that auxin repressed its expression, while ABA induced it. Regarding its role in the maintenance of the cell wall structure, the down-regulation of *FaRGlyase 1* by transient transformation, caused a more organized middle lamina along with a greater area of intercellular contact, suggesting that this enzyme plays a key role in disassembly of the cell wall during strawberry ripening. Similar results were obtained in tomato, where by repressing a gene with high homology to *FaRGlyase 1* fruits were obtained with greater firmness and shelf life. This was accompanied by a rhamnogalacturonan endoliase enzyme activity assay,

confirming that the high firmness and long shelf life was due to low enzyme activity (Ochoa-Jiménez et al., 2018). In *F. chiloensis*, a rhamnogalacturonan endoliase has been isolated and characterized, whose expression increased in advanced stages of ripening of the receptacle, in parallel to a loss of firmness, suggesting an important role in the disassembly of the cell wall (Méndez-Yañez et al., 2020).

These data show that the depolymerization of RG-1 by the action of rhamnogalacturonan lyases, can be a key process in the softening of the fruit during ripening, and therefore, a possible biotechnological target to avoid losses due to overripening.

In this work, fruits from stable transgenic lines with downregulation of *FaRGlyasa 1* gene were characterized. An analysis of the composition and structure of the cell wall was also carried out, to provide more data about the role that RG-1 plays in the structure of the cell wall during ripening, and therefore, in the softening of the fruit.

### Results and Discussion

In this work the fruits of 2 independent transgenic lines of *F. x ananassa* with a significantly down-regulated *FaRGlyase 1* gene have been analyzed and compared with non-transgenic control fruits. The parameters that were analyzed were size, weight, soluble soluble, color and firmness. The development of the fruits was also monitored to compare the ripening times. In addition, a cell wall analysis was done. On the other hand, a transcriptomic analysis was performed with the fruits of each line, including non-transgenic control line.

During the ripening of the strawberry receptacle, one of the most important processes is the change in texture, producing a softening (Paniagua et al., 2014). In general, it is accepted that the main cause of fruit softening is a dissolution in the middle lamella, and therefore to a decrease in the areas of adhesion (Brummell, 2006; Mercado et al., 2011). Pectins are very abundant in the middle lamella, and it seems that they play an important role in cell adhesion, since they can be connected to each other, and with xyloglucans and cellulose from the primary cell wall (Foster et al., 1996; Thompson and Fry, 2000; Willats et al., 2001; Broxterman and Schols, 2018b).

The RG-1 is one of the 3 components of pectins, being after the HG the majority component (Yapo, 2011; Posé et al., 2019). There are studies that suggest the importance of RG-1 in the disassembly of pectins during ripening, and therefore, in cell adhesion (Molina-Hidalgo et al., 2013; Méndez-Yañez et al., 2020). This idea is supported by the firmness analyzes carried out on the transgenic fruits with the down-regulated *FaRGlyase 1* gene, where a significantly higher firmness has been registered in the fruits of both transgenic lines with respect to the control fruits. Molina-Hidalgo et al. (2013) by using transitory transformation of strawberry fruits (*F. x ananassa*), and Ochoa-Jiménez et al. (2018) in tomato obtained similar results increasing the firmness of the fruits when this enzyme was down-regulated.

Firmness was the only parameter in which both transgenic lines showed similar significant differences with respect to the control, suggesting that only firmness was

affected by RNAi down-regulation, while the rest of the changes observed occurred randomly as a consequence of transformation by *Agrobacterium tumefaciens* (Nacry et al., 1998; Labra et al., 2001; Tax and Vernon, 2001; Kumar and Fladung, 2002; Chen et al., 2003; Kim et al., 2003; Bartlett et al., 2014). This hypothesis is supported by the data from the RNA sequencing of these fruits. A significant down-regulation of 20 genes was shown by fruits from FaRG 26 line, whereas only 8 genes were significantly down-regulated in fruits of line FaRG 87. Of these down-regulated genes, only 2 were down-regulated in the fruits of both transgenic lines, both genes being coding for probable rhamnogalacturonan lyase, and by homology, very similar to the characterized rhamnogalacturonan endoliase of the RGL4 family in *F. chiloensis* in the work of Méndez-Yañez et al. (2020). In addition, FaRG 26 fruits showed 94 up-regulated genes, while in fruits of FaRG 87 only 4 were up-regulated. Two genes were up-regulated in both transgenic lines with an unknown function in strawberry, but by sequence homology, one of the proteins is not characterized and the other has an unknown function with a MYB-like DNA binding domain. So, there are no indirect evidences that they are involved in increasing fruit firmness.

The rest of the parameters analyzed did not follow the same trend in both lines since a lower weight and a shorter length and width were registered in the fruits of FaRG 26 with respect to the control fruits, however, no significant differences were shown by FaRG 87. The same occurs in the colour of the fruits, since a significant increase in the L colour space was only registered in FaRG 26, having a brighter colour. A lower amount of soluble solids with respect to the control fruits were reported exclusively by the fruits of FaRG 87.

The change in the size of the fruits of the FaRG 26 line could be due to up-regulation of an actin depolymerization factor. These factors bind to actin filaments and cut them apart, rearranging the cytoskeleton and controlling cell expansion (Maciver, 1998). In *Arabidopsis*, Dong et al. (2001) reported that the down-regulation of one of these factors stimulated cell expansion, while up-regulation caused less organ growth. This agrees that up-regulation of this factor and alteration in the size of the fruits of FaRG 87 line was not observed.

There are studies in papaya and grape that correlate the increase in soluble solids during fruit ripening with the loss of cell wall mass (Nunan et al., 1998; Manrique and Lajolo, 2004), opening the possibility that the increase in soluble solids may be related to the depolymerization of the cell wall. Carpita and Gibeaut, (1993) proposed that during cell elongation the cellulose fragments after depolymerization could be recycled. The results of this work could indicate that the greater amount of pectin components in the fractions covalently linked to the cell wall, as a consequence of less solubilization and / or depolymerization of the cell walls, could not be being reused as a source of hexoses favoring the soluble solids reduction. However, this effect could be hidden in the fruits of the FaRG 26 line by the up-regulation of a gene encoding a sugar transport protein 13, since this protein has been related to the increase in sugar and, therefore, soluble solids, during the ripening of the peach (Zhang et al., 2019).

Although the fruits of both transgenic lines showed a similar time to ripening control fruits, a variation was recorded in the color brightness of the fruits of the FaRG 26 line. It could be due to a change in the composition of the fruit wax that is correlated with a

down-regulation of a 3-ketoacyl-CoA synthase, whose function is necessary to obtain long fatty acid chains in leaf and fruit wax (Millar et al., 1999; Vogg et al., 2004). It is documented that the alteration in the composition of the wax affects the brightness of the fruit (Ward and Nussinovitch, 1996), so it could support this hypothesis. This change was not detected in fruits of the FaRG 87 line.

The different cell wall fractions of the transgenic lines and the control line were weighed in order to compare them. A higher mass of the weakly bound polysaccharide fractions (water), ionically bound (CDTA) and covalently ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) was recorded in both transgenic lines. These results agree with those obtained previously in transgenic fruits with down-regulated pectinase genes (Santiago-Doménech et al., 2008; Quesada et al., 2009; Posé et al., 2013; Paniagua et al., 2016), where in general lines these fractions weighed more in the transgenic lines than in the control line. Furthermore, in these works important differences were not shown in the weights of fractions extracted with 1 M and 4 M KOH. A significant increase in the weight of the soluble fraction extracted with PAW was recorded in both transgenic lines. This result is different from that obtained in previous works. It is documented that as fruit ripening progresses, the fraction of soluble pectins increases, while the fraction of retained pectins decreases (Koh and Melton, 2002; Paniagua et al., 2017; Posé et al., 2019). However, fruits with more soluble polysaccharides and retained polysaccharides have been produced by both transgenic lines, without significantly increasing the difference in unfractionated cell wall weight. This result was supported by the amount of galacturonic acid in the soluble fractions and linked by ionic bonds. On the contrary, significant differences in the amount of glucose in some fraction were not recorded.

A tissue immunofluorescence study to complement the cell wall study was performed. Significant differences in the signal of the antibodies used were not observed in the cells near the vascular tissues of the 3 lines analyzed. This corroborates what has been described in the literature, that the important changes in the cell wall causing the softening of the fruit take place in the cells of the parenchyma (Paniagua et al., 2017; Posé et al., 2019). In parenchymal cells, a significant increase in the fluorescence emitted by the RG-1 main chain specific antibody was quantified in both transgenic lines with respect to the control. This antibody was the only one that showed a significantly higher signal in the fruits of both transgenic lines than in those of control fruits. The signal emitted by this antibody came from primary cell walls, and not from intercellular spaces. An increase in the signal of the arabinan side chain specific antibody exclusive to FaRG 26 line was also recorded, although this increase was less marked than that shown by the RG-1 backbone. These results confirm that the down-regulation of the two rhamnogalacturonan lyases had an important effect in the depolymerization of the RG-1 backbone, increasing their amount.

A microarray with monoclonal antibodies specific for different components of the cell wall was carried out with the fractions of the cell walls from the transgenic lines and the control line. An increase in RG-1 related components (backbone and branches) and highly methyl esterified HG (JIM7) was detected in the soluble fraction of the transgenic lines. In contrast, a higher amount of HG with a low degree of methyl esterification (JIM5 and LM18) was detected in the soluble fraction of the control line. As fruit ripening progresses pectin methyl esterase (PME) demethylates HG (Moya-León et al., 2019). The degree of esterification of HG is important, since after the action of PME

links between chains of HG are established by  $\text{Ca}^{2+}$  (Goldberg et al., 1996; Draye and Van Cutsem, 2008), and in addition, enzymes such as pectate lyase (PL) and polygalacturonase (PG) preferentially act on HG with a low degree of methylation (Draye and Van Cutsem, 2008). The high degree of methylation in the HG of the transgenic lines could be due to a lower activity of the PME, which could affect other enzymes such as PL and PG. This could cause an increase in the rest of the components of the cell wall both in the soluble fraction and in the fraction retained in the primary cell wall of the transgenic lines, affecting the firmness of the fruit, increasing it.

A hypothesis of the cause of the possible alteration in the function of the PME by the down-regulation of *FaRGlyase 1* is the change in pH. The pH appears to be one of the key factors in regulating the action of PME (Moustacas et al., 1991; Draye and Van Cutsem, 2008; Ünal and Şener, 2015). A lower depolymerization of the RG-1 backbone was caused by down-regulated of the two ramnogalacturonan lyases in the fruit, and that due to its composition rich in galacturonic acid could affect the pH. This change in pH could lead to a decrease in the action of PME, which provoked a lower proportion of demethylated HG compared to the esterified one, and therefore less available substrate for the action of other enzymes such as PL and PG causing less solubilization and depolymerization of most of the components of the cell wall. This process would be triggered in the middle lamella, since the soluble fraction is found fundamentally in the intercellular space (Redgwell et al., 1992), but it would affect the pectin fraction anchored in the primary cell wall. The results obtained related to the firmness of this work agree with those obtained in the characterization of two PME in the fruit of *F. vesca* (Xue et al., 2020). Furthermore, Xue et al. (2020) verified alterations in the expression of other cell wall degrading enzymes such as PG and PL associating it with an increase in soluble solids. This could be an argument of the hypothesis formulated, the fruits with *FaRGlyase 1* down-regulated have less amount of soluble solids, as shown in line 87, being this effect hid in line 26; and more firmness of what was previously commented.

A higher amount of glucuronoxylans was shown in the microarrays of the control fruits. Glucuronoxylan signal was recorded in the 4 M KOH and cadoxen (primary cell wall) fractions of the 3 lines analyzed, with a higher signal in the control line. Xylans are an important hemicellulosic component in the primary cell wall, with glucuronoxylans the most abundant subtype in fruits (Assor et al., 2013). There are studies that indicate the ability of pectins to bind cellulose and XG, being an essential component in the maintenance of cell wall structure (Zykwinska et al., 2005; Dick-Pérez et al., 2011; Wang et al., 2012; Tuo Wang et al., 2015; Cornuault et al., 2018; Wang et al., 2018). However, Broxterman and Schols (2018a) showed that the binding of pectins to hemicelluloses was due to covalent bonds between the RG-1 backbones and the glucuronoxylan. Our results show that by blocking the depolymerization of RG-1, the amount of XG is hardly altered, but the amount of glucuronoxylans is significantly reduced. The reduction in the glucuronoxylan signal due to the higher amount of RG-1, may be due to less accessibility of epitopes, that is, a greater depolymerization of RG-1 in the control line allows better access of the primary monoclonal antibodies to the glucuronoxylan epitopes.

In the control fruits, the signal of all the components related to RG-1 was registered only in the 4 M KOH fraction, while in all the fractions (although it was higher in the 4 M KOH fraction) of the transgenic lines, a signal was registered. This suggests that in immature stages of the fruit there is presence of RG-1 (side chains and backbone) in the middle lamella and in the primary cell wall, being higher in the primary cell wall (backbone and ramifications), but as the ripening occurs there is also a difference in the depolymerization of these components, being higher in the middle lamella. This means that in non-transgenic ripe fruits only the signal of components retained in the primary wall was detected, showing the high dynamism of RG-1 during ripening. This interpretation is agreed with the results obtained in the works of Molina-Hidalgo et al. (2013) and Ochoa-Jiménez et al. (2018), where the importance of RG-1 in the maintenance of the integrity of the middle lamella, and therefore the importance of cell adhesion and post-harvest life of strawberry and tomato fruits, respectively, were showed. A higher amount of arabinogalactan proteins in all fractions and a higher amount of HG in fractions bound to the primary cell wall were shown in both transgenic lines. In the soluble fraction, the differences observed in the amount of HG between the different lines have already been commented, as well as the reduction of glucuronoxylan in the fractions attached to the primary wall.

The results obtained suggest that RG-1 could be one of the first components to be depolymerized in a hypothetical sequential action network of different enzymes, since its lower depolymerization affected practically all the components analyzed in the microarrays. Previously, it was proposed that the degradation of the RG-1 side chains was necessary for the access of rhamnogalacturonan lyase to the backbone, and therefore for its action (Rosli et al., 2009; Paniagua et al., 2016). However, when 2 rhamnogalacturonan lyases were down-regulated, we have observed a significant increase in the amount of neutral side chains suggesting the opposite effect, the depolymerization of the RG-1 main chain favors the action of  $\beta$ -galactosidases or arabinofuranosidases. Another possibility is the requirement of the sequential cyclical action of these enzymes, being the product of some the substrate of others, explaining that any alteration in the action of any enzyme causes mismatches in various components of the cell wall.

## **Chapter IV: Exploring the use of fruit callus culture as a model system to study pigments accumulation and cell wall remodeling during strawberry ripening**

### Introduction

Most studies have focused on the cell wall disassembly process taking place during fruit ripening; however, despite the large amount of information available, a general model of cell wall remodeling leading to fruit softening remains elusive (Wang et al., 2018). An additional area of active research in strawberry is the genetic regulation of fruit color. Some key genes involved in the biosynthesis and regulation of flavonoid/phenylpropanoid compounds have been characterized using transgenic approaches (Schaart et al., 2013; Hytönen et al., 2018; Hua Wang et al., 2019; Gao et al., 2020). All these studies have been performed with whole strawberry fruit, a complex organ containing different tissues that differ in their metabolism and that undergo ripening at different rates.

In many cases, cell cultures can be used as simple model systems to study developmental processes, such as stem cell regulation, mineral deficiency or disease and stress responses (Liu et al., 2006; Fernandes et al., 2013; Perez-Garcia and Moreno-Risueno, 2018; Fenning, 2019). In vitro cultures provide a source of uniform plant material that can be easy to handle, avoiding complex interactions among different plant organs and/or tissues. In strawberry, callus from immature fruit has been used to analyze phenol metabolism during the in vitro culture period and its relationship with cell growth (López-Arnaldos et al., 2001; Arnaldos et al., 2002). Strawberry leaf callus has also been employed to characterize anthocyanin synthesis (Mori et al., 1994; Zhang and Furusaki, 1997). Regarding cell wall metabolism, Alayón-Luaces et al. (2012) determined the effect of plant growth regulators in cell wall composition of callus cultures obtained from immature apple fruits. As far as known, the remodeling of cell walls associated with fruit softening has not yet been addressed using callus cultures. The aims of this study were firstly, to produce cell lines from strawberry fruits at different developmental stages, and secondly, to characterize these lines to determine if they could be a useful model system to gain insight into the fruit ripening process, particularly into the regulation of anthocyanin synthesis and the cell wall disassembly associated with fruit softening.

### Results and Discussion

Callus cultures have been induced in strawberry from leaf (Mori et al., 1994), petioles (Edahiro and Seki, 2006), apical meristems (Sato et al., 1996) and immature fruit (Hong et al., 1989; López-Arnaldos et al., 2001) using MS or LS medium supplemented with 2,4-D. Previous studies demonstrated that N<sub>30</sub>K, a mineral formulation with lower ionic strength than MS, was more suitable for micropropagation and regeneration of strawberry 'Chandler' (López-Aranda et al., 1994; Barceló et al., 1998). In this research, this medium was used successfully to obtain callus cultures in leaf explants from this genotype. The presence of 2,4-D was needed to induce callus formation, although callus proliferation was reduced at high auxin concentrations, as previously

observed in some strawberry genotypes by Hong et al. (1989). The addition of BA to the induction medium diminished the amount of callus formed. N<sub>30</sub>K medium supplemented with a low 2,4-D concentration was also suitable for the isolation and proliferation of cell cultures from fruit receptacle at different developmental stages. Explants from red fruit showed the lowest capacity to develop callus in this medium. Similarly, the proliferation rate of the cell lines obtained diminished accordingly to the developmental age of the initial explant, being higher in green immature fruits and lower in ripe fruits. As observed in this research, Hong et al. (1989) reported that the rate of callus formation from strawberry fruit decreased with the age of the explant, but they were unable to obtain callus from nearly mature fruits, collected four weeks after flowering.

Light exerted a minor effect on the proliferation rate of callus cultures; however, it induced the accumulation of red pigmentation in leaf and ripe-fruit lines. A similar observation was made by Hong et al. (1989) in cultivar 'Brighton'. In strawberry fruit, anthocyanin biosynthesis is regulated by the transcription factor *FaMYB10*. Kadomura-Ishikawa et al. (2015) found that light and ABA independently regulate *FaMYB10* expression, and therefore anthocyanin production in strawberry fruit, being their effect additive. The replacement of 2,4-D by ABA, at low concentrations, notably increased anthocyanin production in callus from immature green fruit but did not significantly affect that of the other lines. ABA and auxins play antagonistic effects on strawberry fruit ripening. The results obtained in this research indicate large differences in the regulation of the flavonoid pathway among the different fruit cell lines. Auxin/ABA hormonal balance seems to be the main regulator of anthocyanin production in the cell line from green fruits; however, cultures from ripe fruits mainly respond to light, while those from white fruits showed a low capacity for anthocyanin production. The differential behavior of the fruit cell lines could be exploited to decipher the genetic regulation of pigment accumulation in strawberry fruit.

The pectin profile in cell wall fractions isolated from fruits showed that the amounts of HG and RG-1 epitopes increased from green to white fruit and then declined in red ripe fruit to very low levels. This pattern was observed in all fractions analyzed except in the water fraction from ripe fruit that contained significant amounts of low methyl ester HG recognized by JIM5. These findings support previous observations of pectin solubilization, i.e. a reduction in the amount of pectins tightly bound to the cell wall concomitant to an increase in water-soluble pectins, as a typical feature of strawberry remodeling during fruit ripening (Redgwell et al., 1997a; Quesada et al., 2009; Paniagua et al., 2017; Moya-León et al., 2019). It is noteworthy that a large fraction of pectins, especially RG-1, was extracted with KOH and cadoxen. Pectin and XG can be covalently linked (Popper and Fry, 2005; Thompson and Fry, 2000) and recently, Cornuault et al. (2018) found that a sub-population of pectin was attached to XG in KOH fractions from different fruits, including strawberry. As regards hemicellulose, it has been reported that its content diminished during strawberry ripening in cultivars with contrasting fruit firmness (Koh and Melton, 2002; Rosli et al., 2004). Contrary to those results, the carbohydrate microarray showed that the signal intensity of extractable XG epitopes changed little during ripening of 'Chandler' fruit; however, the results obtained suggest a change in the chemical structure of XG in ripe fruit, increasing the amount of galactosylated XG recognized by LM25. Significant amounts

of glucuronoxylans were also detected in KOH and cadoxen extracts and with an intriguing pattern of relatively lower abundance in white fruit. Heteroxylans are not abundant in primary cell walls of dicotyledoneous plants and the role of glucuronoxylan is unknown. Cornuault et al. (2015) found glucuronoxylan associated with RG-1-enriched fraction from potato tubers. However, our results indicate a negative correlation between the glucuronoxylan signal and RG-1 abundance in matrix glycan fractions.

Carbohydrate profiles from cell cultures were quite different from fruit. In callus cell walls, pectin antibodies showed a very weak signal. By contrast, callus cell wall extracts were enriched in extensin epitopes associated with tightly bound pectins (sodium carbonate fraction) and matrix glycans. Extensins are one of the main classes of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) that contain multiple Ser-(Pro)<sub>3-5</sub> repeats and Tyr motifs acting as cross-link sites (Lampert et al., 2011; Marzol et al., 2018). These proteins are involved in the building and maintenance of primary cell wall. During the cell plate formation, the self-assembling ability of extensins generates scaffolding networks that may serve as template for pectin matrix assembly due to the acid-base interactions between extensin and pectin (Lampert et al., 2011). On the other hand, extensin cross-linking strengthens cell walls, and many biotic and abiotic stresses induce extensin biosynthesis, e.g. pathogen attack or wounding, (Merkouropoulos and Shirsat, 2003; Liu et al., 2016; Portieles et al., 2018). In grape berries, extensin epitopes detected with LM1 and JIM20 increased at véraison, when ripening start; however, its physiological function was unclear (Moore et al., 2014). Contrary to grape, the CoMPP analysis showed that extensin was a minor component in the strawberry cell wall during fruit development. The high extensin content in the strawberry cell cultures may reflect a tightly cross-linked cell wall and could be related to the stressful conditions of *in vitro* tissue culture; in fact, high amounts of extensin have also been found in suspension cells from other species (Dey et al., 1997; Jackson et al., 2001). The stronger extensin epitope signals were detected in sodium carbonate fraction, especially in leaf and green fruit lines, suggesting that these proteins might be linked to pectins, as reported by Nunez et al. (2009). This interaction could also explain the low label of mAb against pectins, i.e. pectin epitopes might be masked in pectin-extensin complexes resulting in a low binding efficiency of HG and RG-1 antibodies. Indeed pectin and other cell wall polysaccharides may be more tightly linked into the cell wall structures of callus cells and therefore less extractable to appear in the solubilized fractions. On the other hand, LM23 binding was detected in all cell wall fractions from callus samples, except water, indicating the presence of xylogalacturonan (XGA) epitopes. This pectin has not previously been described in strawberry fruit but it has been found in hairy regions of apple pectin, another member of Rosaceae family (Schols et al., 1995). XGA has been related to cell adhesion in carrot-cultured cells (Satoh, 1998).

Carbohydrate microarrays provide information about the relative levels of glycan epitopes but does not allow quantifying absolute levels of cell wall components (Moller et al., 2007). In callus cultures, the large amounts of extensin and the apparent lower presence of pectin epitopes make it difficult to compare these cell walls with their corresponding samples from fruits using this approach. However, the hierarchical clustering of microarray data included in the same group the water fractions from both



kind of samples jointly with sodium carbonate fractions from fruits. It is therefore likely that pectin composition in these fractions were comparable. As previously indicated, polyuronides are extensively modified during strawberry ripening (Paniagua et al., 2017; Moya-León et al., 2019). Other techniques such as carbohydrate structural analyses would be needed to precisely determine whether cell walls at different fruit developmental stages and their corresponding cell lines are equivalent. Preliminary ELISA experiments showed that the quantification of unesterified HG detected by LM19 in the sodium carbonate fraction followed the same trend in cell cultures as the one observed in the microarray for fruit stages. Experiments are in progress to determine if the same occurs with other pectin epitopes.

Overall, the results obtained in this research suggest that cell cultures obtained from strawberry receptacle at different developmental stages could be a useful model system to achieve a better understanding of the ripening process in strawberry. Metabolic pathways involved in anthocyanin production or hormonal regulation of ripening could be investigated using this system. Despite the differences observed in cell wall composition in fruits and callus cultures, some changes are detected in the pectin composition of the cell lines that resemble those observed during strawberry ripening, suggesting that it would be interesting to continue testing this system to be used as a model in studies of remodeling of the cell wall during strawberry ripening using other techniques.

# Bibliografía

- Aharoni, A., Keizer, L.C., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M., De Vos, R.C., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen, A.J., O'Connell, A.P., 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12, 647–662. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.647>
- Aharoni, A., O'Connell, A.P., 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J Exp Bot* 53, 2073–2087. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf026>
- Ahn, J.W., Verma, R., Kim, M., Lee, J.Y., Kim, Y.K., Bang, J.W., Reiter, W.D., Pai, H.S., 2006. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J. Biol. Chem.* 281, 13708–13716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512403200>
- Aist, J.R., 1976. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annual Review of Phytopathology* 14, 145–163. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.14.090176.001045>
- Alayón-Luaces, P., Pagano, E.A., Mroginski, L.A., Sozzi, G.O., 2008. Four glycoside hydrolases are differentially modulated by auxins, cytokinins, abscisic acid and gibberellic acid in apple fruit callus cultures. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9438-1>
- Alayón-Luaces, P., Ponce, N.M.A., Mroginski, L.A., Stortz, C.A., Sozzi, G.O., 2012. Compositional changes in cell wall polysaccharides from apple fruit callus cultures modulated by different plant growth regulators. *Plant Sci.* 185–186, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.008>
- Allwood, E.G., Anthony, R.G., Smertenko, A.P., Reichelt, S., Drobak, B.K., Doonan, J.H., Weeds, A.G., Hussey, P.J., 2002. Regulation of the pollen-specific actin-depolymerizing factor LIADF1. *Plant Cell* 14, 2915–2927. <https://doi.org/10.1105/tpc.005363>
- Almeida, J.R.M., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., de Vos, C.H.R., Deiml, B., Mourgues, F., Perrotta, G., Fischer, T.C., Bovy, A.G., 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. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.040>
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., Yadav, R.C., 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* 19, 307–321. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0179-1>
- Amil-Ruiz, F., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., 2011. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant Cell Physiol.* 52, 1873–1903. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr136>
- Amil-Ruiz, F., Garrido-Gala, J., Gadea, J., Blanco-Portales, R., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., de Los Santos, B., Arroyo, F.T., Aguado-Puig, A., Romero, F., Mercado, J.Á., Pliego-Alfaro, F., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., 2016. Partial activation of SA- and JA-defensive pathways in strawberry upon *Colletotrichum acutatum* interaction. *Front Plant Sci* 7, 1036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01036>

- Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Andi, S.A., Gholami, M., Ford, C.M., Maskani, F., 2019. The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 199, 111625. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111625>
- Arnaldos, T.L., Ferrer, M.A., García, A.A.C., Muñoz, R., 2002. Changes in peroxidase activity and isoperoxidase pattern during strawberry (*Fragaria × ananassa*) callus development. *Journal of Plant Physiology* 159, 429–435. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00613>
- Arnaldos, T.L., Muñoz, R., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria xananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum* 113, 315–322. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130303.x>
- Asahira, T., Kano, Y., 1977. Shoot formation from cultured tissue of strawberry fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 46, 317–324. <https://doi.org/10.2503/jjshs.46.317>
- Assor, C., Quemener, B., Vigouroux, J., Lahaye, M., 2013. Fractionation and structural characterization of LiCl-DMSO soluble hemicelluloses from tomato. *Carbohydr Polym* 94, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.001>
- Bacic, A., Harris, P.J., Stone, B.A., 1988. *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press.
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., 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*.
- Barbey, C., Hogshead, M., Schwartz, A.E., Mourad, N., Verma, S., Lee, S., Whitaker, V.M., Folta, K.M., 2019. The genetics of differential gene expression related to fruit traits in strawberry (*Fragaria xananassa*). *Front Genet* 10, 1317. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01317>
- Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Alfaro, F.P., 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54, 29–36. <https://doi.org/10.1023/A:1006031527413>
- Baron-Epel, O., Gharyal, P.K., Schindler, M., 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175, 389–395. <https://doi.org/10.1007/BF00396345>
- Bartlett, J.G., Smedley, M.A., Harwood, W.A., 2014. Analysis of T-DNA/Host-Plant DNA junction sequences in single-copy transgenic Barley lines. *Biology (Basel)* 3, 39–55. <https://doi.org/10.3390/biology3010039>
- Basu, A., Kurien, B.T., Tran, H., Byrd, B., Maher, J., Schell, J., Masek, E., Barrett, J.R., Lyons, T.J., Betts, N.M., Hal Scofield, R., 2018. Strawberries decrease circulating levels of tumor necrosis factor and lipid peroxides in obese adults with knee osteoarthritis. *Food Funct* 9, 6218–6226. <https://doi.org/10.1039/c8fo01194j>
- Basu, A., Rhone, M., Lyons, T.J., 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr. Rev.* 68, 168–177. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x>
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Mérillon, J.M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>
- Benjamins, R., Scheres, B., 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 59, 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103805>

- 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. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90629-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90629-x)
- Bertolini, A., Petrusa, E., Patui, S., Zancani, M., Peresson, C., Casolo, V., Vianello, A., Braidot, E., 2016. Flavonoids and darkness lower PCD in senescing *Vitis vinifera* suspension cell cultures. *BMC Plant Biol.* 16, 233. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0917-y>
- Bombarely, A., Merchante, C., Csukasi, F., Cruz-Rus, E., Caballero, J.L., Medina-Escobar, N., Blanco-Portales, R., Botella, M.A., Muñoz-Blanco, J., Sánchez-Sevilla, J.F., Valpuesta, V., 2010. Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria xananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC Genomics* 11, 503. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-503>
- Broxterman, S.E., Schols, H.A., 2018a. Characterisation of pectin-xylan complexes in tomato primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers* 197, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.003>
- Broxterman, S.E., Schols, H.A., 2018b. Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers* 192, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2108.03.070>
- Brummell, D. A., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biol.* 33, 103–119. <https://doi.org/10.1071/FP05234>
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311–340.
- Brumos, J., Alonso, J.M., Stepanova, A.N., 2014. Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiol Plant* 151, 3–12. <https://doi.org/10.1111/ppl.12098>
- Bustamante, C.A., Rosli, H.G., Añón, M.C., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2006.  $\beta$ -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Sci.* 171, 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.011>
- Calderón-Villalobos, L.I.A., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., Estelle, M., 2012. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat. Chem. Biol.* 8, 477–485. <https://doi.org/10.1038/nchembio.926>
- Cantu, D., Blanco-Ulate, B., Yang, L., Labavitch, J.M., Bennett, A.B., Powell, A.L.T., 2009. Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene. *Plant Physiol* 150, 1434–1449. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138701>
- Capocasa, F., Diamanti, J., Tulipani, S., Battino, M., Mezzetti, B., 2008. Breeding strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) to increase fruit nutritional quality. *Biofactors* 34, 67–72. <https://doi.org/10.1002/biof.5520340107>
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1993.tb00007.x>
- Carrasco-Orellana, C., Stappung, Y., Mendez-Yañez, A., Allan, A.C., Espley, R.V., Plunkett, B.J., Moya-Leon, M.A., Herrera, R., 2018. Characterization of a ripening-related transcription factor FcNAC1 from *Fragaria chiloensis* fruit. *Sci Rep* 8, 10524. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28226-y>
- Castillejo, C., de la Fuente, J.I., Iannetta, P., Botella, M.A., Valpuesta, V., 2004. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *J. Exp. Bot.* 55, 909–918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh102>



- Casto, B.C., Knobloch, T.J., Galioto, R.L., Yu, Z., Accurso, B.T., Warner, B.M., 2013. Chemoprevention of oral cancer by lyophilized strawberries. *Anticancer Res.* 33, 4757–4766.
- Chai, Y., Zhang, Q., Tian, L., Li, C.L., Xing, Y., Qin, L., Shen, Y.Y., 2012. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. *Plant Growth Regul* 69, 63–69. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9747-6>
- Chai, Y.M., Jia, H.F., Li, C.L., Dong, Q.H., Shen, Y.Y., 2011. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 62, 5079–5089. <https://doi.org/10.1093/jxb/err207>
- Chen, H., Lai, Z., Shi, J., Xiao, Y., Chen, Z., Xu, X., 2010. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology* 10, 281. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-281>
- Chen, H.I., Li, P.F., Yang, C.H., 2019. NAC-Like Gene GIBBERELLIN SUPPRESSING FACTOR regulates the gibberellin metabolic pathway in response to cold and drought stresses in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 9, 19226. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55429-8>
- Chen, J., Liu, D., Jiang, Y., Zhao, M., Shan, W., Kuang, J., Lu, W., 2011. Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024649>
- Chen, J., Varner, J.E., 1985. Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33-kDa protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4399–4403.
- Chen, Q., Wang, Q., Xiong, L., Lou, Z., 2011. A structural view of the conserved domain of rice stress-responsive NAC1. *Protein Cell* 2, 55–63. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1010-9>
- Chen, S., Jin, W., Wang, M., Zhang, F., Zhou, J., Jia, Q., Wu, Y., Liu, F., Wu, P., 2003. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant J.* 36, 105–113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01860.x>
- Chen, X.Y., Kim, J.Y., 2009. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4, 489. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., Sheen, J., 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14, 2723–2743. <https://doi.org/10.1105/tpc.006494>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04384.x>
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A., Bennett, A.B., 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol* 121, 1273–1279. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1273>
- Clausen, M.H., Willats, W.G.T., Knox, J.P., 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homogalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM5 and JIM7. *Carbohydr. Res.* 338, 1797–1800. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(03\)00272-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(03)00272-6)
- Cohen, J.D., 1996. In vitro tomato fruit cultures demonstrate a role for Indole-3-acetic acid in regulating fruit ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121, 520–524. <https://doi.org/10.21273/JASHS.121.3.520>
- Concha, C.M., Figueroa, N.E., Poblete, L.A., Oñate, F.A., Schwab, W., Figueroa, C.R., 2013. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>



- Contador, L., Shinya, P., Infante, R., 2015. Texture phenotyping in fresh fleshy fruit. *Scientia Horticulturae* 193, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.025>
- Cooper, J.B., Chen, J.A., Gerrit-Jan, van H., Varner, J.E., 1987. Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends in Biochemical Sciences* 12, 24–27. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90012-0)
- Cornuault, V., Buffetto, F., Rydahl, M.G., Marcus, S.E., Torode, T.A., Xue, J., Crépeau, M.J., Faria-Blanc, N., Willats, W.G.T., Dupree, P., Ralet, M.C., Knox, J.P., 2015. Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glycans of plant cell walls. *Planta* 242, 1321–1334. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2375-4>
- Cornuault, V., Posé, S., Knox, J.P., 2018. Disentangling pectic homogalacturonan and rhamnogalacturonan-I polysaccharides: Evidence for sub-populations in fruit parenchyma systems. *Food Chem* 246, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.025>
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M., Fernie, A.R., Rathjen, J.P., Botella, M.A., Valpuesta, V., Medina-Escobar, N., 2011. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytol.* 191, 376–390. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03700.x>
- da Silva, F.L., Escribano-Bailón, M.T., Pérez Alonso, J.J., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology* 40, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- Daminato, M., Guzzo, F., Casadoro, G., 2013. A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *J. Exp. Bot.* 64, 3775–3786. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert214>
- Darnell, R.L., Cantliffe, D.J., Kirschbaum, D.S., Chandler, C.K., 2003. The physiology of flowering in strawberry, in: *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 325–349. <https://doi.org/10.1002/9780470650851.ch6>
- Darrow, G.M., 1966. The strawberry. History, breeding and physiology. CABDirect, xvi, pp. 447. ID:19681601719
- de Jong, M., Mariani, C., Vriezen, W.H., 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J. Exp. Bot.* 60, 1523–1532. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp094>
- Delmas, F., Séveno, M., Northey, J.G.B., Hernould, M., Lerouge, P., McCourt, P., Chevalier, C., 2008. The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.* 59, 2639–2647. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern118>
- Dey, P.M., Brownleader, M.D., Pantelides, A.T., Trevan, M., Smith, J.J., Saddler, G., 1997. Extensin from suspension-cultured potato cells: a hydroxyproline-rich glycoprotein, devoid of agglutinin activity. *Planta* 202, 179–187. <https://doi.org/10.1007/s004250050117>
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., Estelle, M., 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell* 9, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.014>
- Diamanti, J., Capocasa, F., Balducci, F., Battino, M., Hancock, J., Mezzetti, B., 2012. Increasing strawberry fruit sensorial and nutritional quality using wild and cultivated germplasm. *PLoS ONE* 7, e46470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046470>
- Diamanti, J., Mazzoni, L., Balducci, F., Cappelletti, R., Capocasa, F., Battino, M., Dobson, G., Stewart, D., Mezzetti, B., 2014. Use of wild genotypes in breeding program increases strawberry fruit sensorial and nutritional quality. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3944–3953. <https://doi.org/10.1021/jf500708x>



- Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zobotina, O.A., Hong, M., 2011. Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50, 989–1000. <https://doi.org/10.1021/bi101795q>
- Dong, C.H., Xia, G.X., Hong, Y., Ramachandran, S., Kost, B., Chua, N.H., 2001. ADF Proteins are involved in the control of flowering and regulate F-Actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1333–1346.
- Dong, T., Hu, Z., Deng, L., Wang, Y., Zhu, M., Zhang, J., Chen, G., 2013. A tomato MADS-box transcription factor, SIMADS1, acts as a negative regulator of fruit ripening. *Plant Physiol.* 163, 1026–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224436>
- Draye, M., Van Cutsem, P., 2008. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology* 165, 1152–1160. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.10.006>
- Edahiro, J., Seki, M., 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 8–13. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.8>
- Edger, P.P., Smith, R., McKain, M.R., Cooley, A.M., Vallejo-Marin, M., Yuan, Y., Bewick, A.J., Ji, L., Platts, A.E., Bowman, M.J., Childs, K.L., Washburn, J.D., Schmitz, R.J., Smith, G.D., Pires, J.C., Puzey, J.R., 2017. Subgenome dominance in an interspecific hybrid, synthetic allopolyploid, and a 140-Year-old naturally established neo-allopolyploid monkeyflower. *Plant Cell* 29, 2150–2167. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00010>
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J., Bacic, A., 2010. Arabinogalactan-Proteins: Key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* 153, 403–419. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156000>
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Larsen, S., Lo Leggio, L., 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep.* 5, 297–303. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400093>
- Eskin, N.A.M., 2012. Plant pigments, flavors and textures: the chemistry and biochemistry of selected compounds. Elsevier.
- Estrada, A.F., Youssar, L., Scherzinger, D., Al-Babili, S., Avalos, J., 2008. The ylo-1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase responsible for the last reaction in the Neurospora carotenoid pathway. *Molecular Microbiology* 69, 1207–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06349.x>
- Estrada-Johnson, E., Csukasi, F., Pizarro, C.M., Vallarino, J.G., Kiryakova, Y., Vioque, A., Brumos, J., Medina-Escobar, N., Botella, M.A., Alonso, J.M., Fernie, A.R., Sánchez-Sevilla, J.F., Osorio, S., Valpuesta, V., 2017. Transcriptomic analysis in strawberry fruits reveals active auxin biosynthesis and signaling in the ripe receptacle. *Front Plant Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00889>
- Fait, A., Hanhineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V.J., Fernie, A.R., Aharoni, A., 2008. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiol.* 148, 730–750. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120691>
- FAOSTAT, 2020 URL: [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity) (accessed 2.6.20).
- Fenning, T.M., 2019. The use of tissue culture and in-vitro approaches for the study of tree diseases. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 136, 415-430. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01531-0>
- Fernandes, J.C., García-Angulo, P., Goulao, L.F., Acebes, J.L., Amâncio, S., 2013. Mineral stress affects the cell wall composition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus. *Plant Sci.* 205–206, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.01.013>

- Figueroa, C.R., Pimentel, P., Dotto, M.C., Civello, P.M., Martínez, G.A., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2009. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: Effect of auxin treatment. *Postharvest Biology and Technology* 53, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.02.005>
- Figueroa, C.R., Pimentel, P., Gaete-Eastman, C., Moya, M., Herrera, R., Caligari, P.D.S., Moya-León, M.A., 2008. Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes. *Postharvest Biology and Technology* 49, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.01.018>
- Figueroa, C.R., Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2010. Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria xananassa* fruits. *Scientia Horticulturae* 124, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.02.003>
- Fincher, G.B., Stone, B.A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in cereal science and technology (USA)*. *AGRIS* 8, 207–295.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., Clarke, A.E., 1983. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 34, 47–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.000403>
- Foster, T.J., Ablett, S., McCann, M.C., Gidley, M.J., 1996. Mobility-resolved <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of primary plant cell walls. *Biopolymers* 39, 51–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199607\)39:1<51::AID-BIP6>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199607)39:1<51::AID-BIP6>3.0.CO;2-U)
- Fraser, P.D., Bramley, P., Seymour, G.B., 2001. Effect of the *Cnr* mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. *Phytochemistry* 58, 75–79. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00175-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00175-3)
- Fredericks, C.H., Fanning, K.J., Gidley, M.J., Netzel, G., Zabarar, D., Herrington, M., Netzel, M., 2013. High-anthocyanin strawberries through cultivar selection. *J. Sci. Food Agric.* 93, 846–852. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5806>
- Frietze, S., Farnham, P.J., 2011. Transcription factor effector domains. *Subcell Biochem* 52, 261–277. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9069-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9069-0_12)
- Fu, C.C., Han, Y.C., Fan, Z.Q., Chen, J.Y., Chen, W.X., Lu, W.J., Kuang, J.F., 2016. The papaya transcription factor CpNAC1 modulates carotenoid biosynthesis through activating phytoene desaturase genes CpPDS2/4 during fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* 64, 5454–5463. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01020>
- Fu, C.C., Han, Y.C., Kuang, J.F., Chen, J.Y., Lu, W.J., 2017. Papaya CpEIN3a and CpNAC2 co-operatively regulate carotenoid biosynthesis-related genes CpPDS2/4, CpLCY-e and CpCHY-b during fruit ripening. *Plant Cell Physiol.* 58, 2155–2165. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx149>
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.Y., Cutler, S.R., Sheen, J., Rodriguez, P.L., Zhu, J.K., 2009. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462, 660–664. <https://doi.org/10.1038/nature08599>
- Fujii, H., Zhu, J.K., 2009. Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8380–8385. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903144106>
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1988–1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505667103>

- Furio, R.N., Albornoz, P.L., Coll, Y., Martínez Zamora, G.M., Salazar, S.M., Martos, G.G., Díaz Ricci, J.C., 2019. Effect of natural and synthetic Brassinosteroids on strawberry immune response against *Colletotrichum acutatum*. *European journal of plant pathology*. *Eur. J. Plant Pathol.* 153, 167-181. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1551-3>
- Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I., 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* 19, 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Gao, Q., Luo, H., Li, Y., Liu, Z., Kang, C., 2019. Genetic modulation of RAP alters fruit coloration in both wild and cultivated strawberry. *Plant Biotechnology Journal* n/a. <https://doi.org/10.1111/pbi.13317>
- Gao, Y., Wei, W., Fan, Z., Zhao, X., Zhang, Y., Jing, Y., Zhu, B., Zhu, H., Shan, W., Chen, J., Grierson, D., Luo, Y., Jemrić, T., Jiang, C.Z., Fu, D.Q., 2020. Re-evaluation of the nor mutation and the role of the NAC-NOR transcription factor in tomato fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 71, 3560–3574. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa131>
- Gao, Y., Wei, W., Zhao, X., Tan, X., Fan, Z., Zhang, Y., Jing, Y., Meng, L., Zhu, B., Zhu, H., Chen, J., Jiang, C.Z., Grierson, D., Luo, Y., Fu, D.Q., 2018. A NAC transcription factor, NOR-like1, is a new positive regulator of tomato fruit ripening. *Hortic Res* 5, 75. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0111-5>
- Gapper, N.E., McQuinn, R.P., Giovannoni, J.J., 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 82, 575–591. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0050-3>
- García-Gago, J.A., Posé, S., Muñoz-Blanco, J., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2009. The polygalacturonase FaPG1 gene plays a key role in strawberry fruit softening. *Plant Signal Behav* 4, 766–768.
- Gaspar, Y., Johnson, K.L., McKenna, J.A., Bacic, A., Schultz, C.J., 2001. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47, 161–176.
- Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., Mackey, D., 2012. The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of *Arabidopsis* defense. *The Plant Cell* 24, 4763–4774. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105312>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Cordero, M.D., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Astolfi, P., Rubini, C., Zizzi, A., Tulipani, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2017. Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chem* 234, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.017>
- Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J.M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2015. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct* 6, 1386–1398. <https://doi.org/10.1039/c5fo00147a>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Battino, M., 2012. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Giovannoni, J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 725–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.725>
- Giovannoni, J., Nguyen, C., Ampofo, B., Zhong, S., Fei, Z., 2017. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology* 68, 61–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906>
- Giovannoni, J.J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, S170–S180. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>

- Giusti, M.M., Rodríguez-Saona, L.E., Wrolstad, R.E., 1999. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4631–4637.
- Given, N.K., Venis, M.A., Gierson, D., 1988a. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174, 402–406. <https://doi.org/10.1007/BF00959527>
- Given, N.K., Venis, M.A., Grierson, D., 1988b. Phenylalanine Ammonia-Lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology* 133, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80079-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80079-8)
- Glushka, J.N., Terrell, M., York, W.S., O'Neill, M.A., Gucwa, A., Darvill, A.G., Albersheim, P., Prestegard, J.H., 2003. Primary structure of the 2-O-methyl-alpha-L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 338, 341–352. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00461-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00461-5)
- Gol, N.B., Patel, P.R., Ramana-Rao, T.V., 2013. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology* 85, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>
- Goldberg, R., Morvan, C., Jauneau, A., Jarvis, M.C., 1996. Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall, in: Visser, J., Voragen, A.G.J. (Eds.), *Progress in Biotechnology, Pectins and Pectinases*. Elsevier, pp. 151–172. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80253-X](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80253-X)
- Goulao, L.F., Oliveira, C.M., 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* 19, 4–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.002>
- Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M.L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Muñoz-Blanco, J., Schwab, W., 2008. Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 146, 1528–1539. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114280>
- Gu, T., Jia, S., Huang, X., Wang, L., Fu, W., Huo, G., Gan, L., Ding, J., Li, Y., 2019. Transcriptome and hormone analyses provide insights into hormonal regulation in strawberry ripening. *Planta* 250, 145–162. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03155-w>
- Guan, Y., Nothnagel, E.A., 2004. Binding of arabinogalactan proteins by Yariv Phenylglycoside Triggers Wound-Like responses in Arabidopsis cell cultures. *Plant Physiol* 135, 1346–1366. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039370>
- Hagen, G., Guilfoyle, T., 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49, 373–385. <https://doi.org/10.1023/A:1015207114117>
- Harberd, N.P., Belfield, E., Yasumura, Y., 2009. The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: How an “Inhibitor of an Inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *The Plant Cell* 21, 1328–1339. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066969>
- Harpster, M.H., Brummell, D.A., Dunsmuir, P., 1998. Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4-β-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiology* 118, 1307–1316. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1307>
- Härtl, K., Denton, A., Franz-Oberdorf, K., Hoffmann, T., Spornraft, M., Usadel, B., Schwab, W., 2017. Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes. *Scientific Reports* 7, 45113. <https://doi.org/10.1038/srep45113>
- Hawkins, C., Caruana, J., Schiksnis, E., Liu, Z., 2016. Genome-scale DNA variant analysis and functional validation of a SNP underlying yellow fruit color in wild strawberry. *Sci Rep* 6, 29017. <https://doi.org/10.1038/srep29017>



- He, X.J., Mu, R.L., Cao, W.H., Zhang, Z.G., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2005. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant J.* 44, 903–916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02575.x>
- He, Y., Hao, Q., Li, W., Yan, C., Yan, N., Yin, P., 2014. Identification and characterization of ABA receptors in *Oryza sativa*. *PLoS ONE* 9, e95246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095246>
- Hervé du Penhoat, C., Gey, C., Pellerin, P., Perez, S., 1999. An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. *J. Biomol. NMR* 14, 253–271. <https://doi.org/10.1023/a:1008312423877>
- Higuera, J.J., Garrido-Gala, J., Lekhbou, A., Arjona-Girona, I., Amil-Ruiz, F., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Muñoz-Blanco, J., López-Herrera, C.J., Caballero, J.L., 2019. The strawberry FaWRKY1 transcription factor negatively regulates resistance to *Colletotrichum acutatum* in fruit upon infection. *Front Plant Sci* 10, 480. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00480>
- Hong, Y.C., Read, P.E., Harlander, S.K., Labuza, T.P., 1989. Development of a tissue culture system from immature strawberry fruits. *Journal of Food Science* 54, 388–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb03089.x>
- Hossain, M.R., Kim, H.T., Shanmugam, A., Nath, U.K., Goswami, G., Song, J.Y., Park, J.I., Nou, I.S., 2018. Expression profiling of regulatory and biosynthetic genes in contrastingly anthocyanin rich strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars reveals key genetic determinants of fruit color. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030656>
- Hu, W.J., Kawaoka, A., Tsai, C.J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H., Chiang, V.L., 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5407–5412. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5407>
- Hu, Y., Bao, F., Li, J., 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 693–701. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x>
- Hu, Y., Dong, Q., Yu, D., 2012. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 185–186, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.003>
- Hu, Y., Han, Y.T., Wei, W., Li, Y.J., Zhang, K., Gao, Y.R., Zhao, F.L., Feng, J.Y., 2015. Identification, isolation, and expression analysis of heat shock transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Front Plant Sci* 6, 736. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00736>
- Huang, D., Wang, S., Zhang, B., Shang-Guan, K., Shi, Y., Zhang, D., Liu, X., Wu, K., Xu, Z., Fu, X., Zhou, Y., 2015. A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. *Plant Cell* 27, 1681–1696. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00015>
- Huber, D.J., 1984. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* 49, 1310–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb14976.x>
- Hummer, K.E., 2011. A new species of *Fragaria* (rosaceae) from Oregon. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* 6, 9–15. <https://www.jstor.org/stable/41972353>
- Hummer, K.E., Hancock, J., 2009. Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. *Genetics and Genomics of Rosaceae*, 413–435. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_20)
- Hwang, Y.S., Min, J.H., Kim, D.Y., Kim, J.G., Huber, D.J., 2012. Potential mechanisms associated with strawberry fruit firmness increases mediated by elevated pCO<sub>2</sub>. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53, 41–48. <https://doi.org/10.1007/s13580-012-0097-0>

- Hytönen, T., Graham, J., Harrison, R. (Eds.), 2018. The genomes of rosaceous berries and their wild relatives. Springer International Publishing. 10.1007/978-3-319-76020-9
- Ishida, B.K., Baldwin, E.A., Buttery, R.G., Chui, S.H., Ling, L.C., 1993. Flavor volatiles, sugars and color development in ripening in vitro-cultured tomato fruit and calyx. *Physiologia Plantarum* 89, 861–867. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb05297.x>
- Jackson, P.A., Galinha, C.I., Pereira, C.S., Fortunato, A., Soares, N.C., Amâncio, S.B., Pinto Ricardo, C.P., 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiol.* 127, 1065–1076. <https://doi.org/10.1104/pp.010192>
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A., 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436.
- Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., Pont-Lezica, R., 2008. Recent advances in plant cell wall proteomics. *PROTEOMICS* 8, 893–908. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700938>
- Jarvis, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell & Environment* 7, 153–164. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11614586>
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O’Shea, C., Skriver, K., 2010. The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem. J.* 426, 183–196. <https://doi.org/10.1042/BJ20091234>
- Ji, K., Chen, P., Sun, L., Wang, Y., Dai, S., Li, Q., Li, P., Sun, Y., Wu, Y., Duan, C., Leng, P., 2012. Non-climacteric ripening in strawberry fruit is linked to ABA, FaNCED2 and FaCYP707A1. *Functional Plant Biol.* 39, 351–357. <https://doi.org/10.1071/FP11293>
- Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., Wang, B., Cui, L., Fang, J., 2016. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnol J* 14, 2045–2065. <https://doi.org/10.1111/pbi.12563>
- 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 Phytol.* 198, 453–465. <https://doi.org/10.1111/nph.12176>
- Jia, H.F., Chai, Y.M., Li, C.L., Lu, D., Luo, J.J., Qin, L., Shen, Y.Y., 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* 157, 188–199. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>
- Jiang, C.J., Weeds, A.G., Hussey, P.J., 1997. The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J.* 12, 1035–1043. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12051035.x>
- Jiang, G., Li, Z., Song, Y., Zhu, H., Lin, S., Huang, R., Jiang, Y., Duan, X., 2019. LcNAC13 physically interacts with LcR1MYB1 to coregulate anthocyanin biosynthesis-related genes during litchi fruit ripening. *Biomolecules* 9, 135. <https://doi.org/10.3390/biom9040135>
- Jiang, G., Yan, H., Wu, F., Zhang, D., Zeng, W., Qu, H., Chen, F., Tan, L., Duan, X., Jiang, Y., 2017. Litchi fruit LcNAC1 is a target of LcMYC2 and regulator of fruit senescence through its interaction with LcWRKY1. *Plant Cell Physiol.* 58, 1075–1089. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx054>
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevaldo, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128, 751–759. <https://doi.org/10.1104/pp.010671>

- Jimenez-Lopez, J.C., Lopez-Valverde, F.J., Robles-Bolivar, P., Lima-Cabello, E., Gachomo, E.W., Kotchoni, S.O., 2016. Genome-Wide identification and functional classification of tomato (*Solanum lycopersicum*) aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164798>
- Jin, C., Li, K.Q., Xu, X.Y., Zhang, H.P., Chen, H.X., Chen, Y.H., Hao, J., Wang, Y., Huang, X.S., Zhang, S.L., 2017. A novel NAC transcription factor, PbeNAC1, of *Pyrus betulifolia* confers cold and drought tolerance via interacting with PbeDREBs and activating the expression of stress-responsive genes. *Front Plant Sci* 8, 1049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01049>
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.C., Meng, Y.Q., Kong, L., Luo, J., Gao, G., 2017. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res* 45, 1040–1045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw982>
- Kadomura-Ishikawa, Y., Miyawaki, K., Takahashi, A., Masuda, T., Noji, S., 2015. Light and abscisic acid independently regulated FaMYB10 in *Fragaria x ananassa* fruit. *Planta* 241, 953–965. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2228-6>
- Kang, C., Darwish, O., Geretz, A., Shahan, R., Alkharouf, N., Liu, Z., 2013. Genome-scale transcriptomic insights into early-stage fruit development in woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Cell* 25, 1960–1978. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111732>
- Kano, Y., Asahira, T., 1979. Effect of endogenous cytokinins in strawberry fruits on their maturing. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 47, 463–472. <https://doi.org/10.2503/jjshs.47.463>
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A., 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G.C., Seymour, G.B., de Maagd, R.A., 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J Exp Bot* 65, 4527–4541. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru316>
- Karlova, R., Rosin, F.M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P.T., Fernie, A.R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G.C., de Maagd, R.A., 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23, 923–941. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081273>
- Kepinski, S., Leyser, O., 2005. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435, 446–451. <https://doi.org/10.1038/nature03542>
- Khatun, K., Robin, A.H.K., Park, J.I., Kim, C.K., Lim, K.B., Kim, M.B., Lee, D.J., Nou, I.S., Chung, M.Y., 2016. Genome-wide identification, characterization and expression profiling of adf family genes in *Solanum lycopersicum* L. *Genes (Basel)* 7, 79. <https://doi.org/10.3390/genes7100079>
- Kim, H.J., Nam, H.G., Lim, P.O., 2016. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.002>
- Kim, S.G., Lee, S., Ryu, J., Park, C.M., 2010. Probing protein structural requirements for activation of membrane-bound NAC transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Science* 178, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.12.007>
- Kim, S.R., Lee, J., Jun, S.H., Park, S., Kang, H.G., Kwon, S., An, G., 2003. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52, 761–773. <https://doi.org/10.1023/A:1025093101021>
- Klie, S., Osorio, S., Tohge, T., Drincovich, M.F., Fait, A., Giovannoni, J.J., Fernie, A.R., Nikoloski, Z., 2014. Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species. *Plant Physiol.* 164, 55–68. <https://doi.org/10.1104/pp.113.226142>
- Koh, T.H., Melton, L.D., 2002. Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* 26, 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00003-0)

- Kou, X., Liu, C., Han, L., Wang, S., Xue, Z., 2016. NAC transcription factors play an important role in ethylene biosynthesis, reception and signaling of tomato fruit ripening. *Mol. Genet. Genomics* 291, 1205–1217. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1177-0>
- Kračun, S.K., Fangel, J.U., Rydahl, M.G., Pedersen, H.L., Vidal-Melgosa, S., Willats, W.G.T., 2017. Carbohydrate microarray technology applied to high-throughput mapping of plant cell wall glycans using comprehensive microarray polymer profiling (CoMPP). *Methods Mol. Biol.* 1503, 147–165. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6493-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6493-2_12)
- Kumar, A., Ellis, B.E., 2003. 4-Coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. *Plant Mol Biol* 51, 327–340. <https://doi.org/10.1023/A:1022004923982>
- Kumar, S., Fladung, M., 2002. Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J.* 31, 543–551. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01368.x>
- Kunwar, R.M., Shrestha, K.P., Bussmann, R.W., 2010. Traditional herbal medicine in Far-west Nepal: a pharmacological appraisal. *J Ethnobiol Ethnomed* 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-35>
- Kwon, C., Bednarek, P., Schulze-Lefert, P., 2008. Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiology* 147, 1575–1583. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121566>
- Labra, M., Savini, C., Bracale, M., Pelucchi, N., Colombo, L., Bardini, M., Sala, F., 2001. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 20, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s002990100329>
- Lamport, D.T.A., Kieliszewski, M.J., Chen, Y., Cannon, M.C., 2011. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* 156, 11–19. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169011>
- Langan, K.J., Nothnagel, E.A., 1997. Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma* 196, 87–98. <https://doi.org/10.1007/BF01281062>
- Latchman, D.S., 1993. Transcription factors: an overview. *Int J Exp Pathol* 74, 417–422. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X)
- Latham, J.R., Wilson, A.K., Steinbrecher, R.A., 2006. The mutational consequences of plant transformation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 7. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/25376>
- Lau, J.M., McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1985. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research* 137, 111–125. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85153-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85153-3)
- Lazo, G.R., Stein, P.A., Ludwig, R.A., 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N.Y.)* 9, 963–967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
- Lee, C.H., Min, J.H., Kim, T.I., Kim, J.G., Matsumoto, K., Kim, D.Y., Hwang, Y.S., 2011. Comparison of wall polymers among three genetically closely related strawberry cultivars with different fruit firmness. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 52, 581–589. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0039-2>
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C., Rothan, C., 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol.* 139, 750–769. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063719>
- Lerouge, P., O'Neill, M.A., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1993. Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr. Res.* 243, 359–371. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87039-u](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87039-u)

- Leszczuk, A., Pieczywek, P.M., Gryta, A., Fraç, M., Zdunek, A., 2019. Immunocytochemical studies on the distribution of arabinogalactan proteins (AGPs) as a response to fungal infection in *Malus x domestica* fruit. *Sci Rep* 9, 17428. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54022-3>
- Li, W., Wang, L., Sheng, X., Yan, C., Zhou, R., Hang, J., Yin, P., Yan, N., 2013. Molecular basis for the selective and ABA-independent inhibition of PP2CA by PYL13. *Cell Res* 23, 1369–1379. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.143>
- Liang, M., Li, Hongjuan, Zhou, F., Li, Huiyong, Liu, J., Hao, Y., Wang, Y., Zhao, H., Han, S., 2015. Subcellular distribution of NTL transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Traffic* 16, 1062–1074. <https://doi.org/10.1111/tra.12311>
- Liao, X., Li, M., Liu, B., Yan, M., Yu, X., Zi, H., Liu, R., Yamamuro, C., 2018. Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. *PNAS* 115, E11542–E11550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812575115>
- Linsmaier, E.M., Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100–127. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x>
- Lin-Wang, K., McGhie, T.K., Wang, M., Liu, Y., Warren, B., Storey, R., Espley, R.V., Allan, A.C., 2014. Engineering the anthocyanin regulatory complex of strawberry (*Fragaria vesca*). *Front Plant Sci* 5, 651. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00651>
- Liston, A., Cronn, R., Ashman, T.L., 2014. *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany* 101, 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>
- Liu, B., Wang, K., Shu, X., Liang, J., Fan, X., Sun, L., 2019. Changes in fruit firmness, quality traits and cell wall constituents of two highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during postharvest cold storage. *Scientia Horticulturae* 246, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.042>
- Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M., Moriguchi, T., 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* 57, 2589–2599. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl018>
- Liu, M., Ma, Z., Zheng, T., Wang, J., Huang, L., Sun, W., Zhang, Y., Jin, W., Zhan, J., Cai, Y., Tang, Y., Wu, Q., Tang, Z., Bu, T., Li, C., Chen, H., Zhao, G., 2018. The potential role of auxin and abscisic acid balance and FtARF2 in the final size determination of Tartary Buckwheat fruit. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092755>
- Liu, X., Wolfe, R., Welch, L.R., Domozych, D.S., Popper, Z.A., Showalter, A.M., 2016. Bioinformatic identification and analysis of extensins in the plant kingdom. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150177>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42, D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- López-Aranda, J.M., Pliego-Alfaro, E., López-Navidad, I., Barceló-Muñoz, E., 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal of Horticultural Science* 69, 625–637. <https://doi.org/10.1080/14620316.1994.11516494>
- Lu, W., Chen, J., Ren, X., Yuan, J., Han, X., Mao, L., Ying, T., Luo, Z., 2018. One novel strawberry MADS-box transcription factor FaMADS1a acts as a negative regulator in fruit ripening. *Scientia Horticulturae* 227, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.042>

- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J., 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 183–193. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0149>
- Luscombe, N.M., Thornton, J.M., 2002. Protein-DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity. *J. Mol. Biol.* 320, 991–1009. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00571-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00571-5)
- Ma, N., Feng, H., Meng, X., Li, D., Yang, D., Wu, C., Meng, Q., 2014. Overexpression of tomato SINAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening. *BMC Plant Biol.* 14, 351. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0351-y>
- Maciver, S.K., 1998. How ADF/cofilin depolymerizes actin filaments. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 140–144. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80097-5)
- Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., Boyce, M.C., Saari, N., 2012. Compositional variation in sugars and organic acids at different maturity stages in selected small fruits from Pakistan. *Int J Mol Sci* 13, 1380–1392. <https://doi.org/10.3390/ijms13021380>
- Manning, K., Tör, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J., Seymour, G.B., 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* 38, 948–952. <https://doi.org/10.1038/ng1841>
- Manrique, G.D., Lajolo, F.M., 2004. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest Biology and Technology* 33, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.01.007>
- Marcos, R., Izquierdo, Y., Velloso, T., Kulasekaran, S., Cascón, T., Hamberg, M., Castresana, C., 2015. 9-Lipoxygenase-Derived oxylipins activate brassinosteroid signaling to promote cell wall-based defense and limit pathogen infection. *Plant Physiol* 169, 2324–2334. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00992>
- Margara, J., 1984. Bases de la multiplicación vegetativa (les méristèmes et l'organogenèse). INRA, Paris 262 p.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., Marion-Poll, A., 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15, 2331–2342.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J.J., 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. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181107>
- Marzol, E., Borassi, C., Bringas, M., Sede, A., Rodríguez García, D.R., Capece, L., Estevez, J.M., 2018. Filling the gaps to solve the extensin puzzle. *Mol Plant* 11, 645–658. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.003>
- Matsumoto, K., Hwang, Y.S., Lee, C.H., Huber, D.J., 2010. Changes in firmness and pectic polysaccharide solubility in three cultivars of strawberry fruit following short-term exposure to high Pco2. *Journal of Food Quality* 33, 312–328. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00319.x>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00079>
- McCann, M.C., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey, N.J., Catchpole, G., Defernez, M., Carpita, N.C., Hofte, H., Ulvskov, P., Wilson, R.H., Roberts, K., 2001. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* 57, 811–821. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00144-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00144-3)
- Mccann, M.C., Wells, B., Roberts, K., 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 96, 323–334.

- McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1980. Structure of plant cell walls: x. rhamnogalacturonan i, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 66, 1128–1134. <https://doi.org/10.1104/pp.66.6.1128>
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J., 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.
- Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., 1997. Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol Biol* 34, 867–877. <https://doi.org/10.1023/A:1005847326319>
- Medina-Puche, L., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Cumplido-Laso, G., García-Caparrós, N., Moyano-Cañete, E., Caballero-Repullo, J.L., Muñoz-Blanco, J., Rodríguez-Franco, A., 2016. Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Funct. Integr. Genomics* 16, 671–692. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0510-3>
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., Hoffmann, T., Ring, L., Rodríguez-Franco, A., Caballero, J.L., 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 x ananassa* fruits. *J. Exp. Bot.* 65, 401–417. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert377>
- Méndez-Yañez, A., González, M., Carrasco-Orellana, C., Herrera, R., Moya-León, M.A., 2020. Isolation of a rhamnogalacturonan lyase expressed during ripening of the Chilean strawberry fruit and its biochemical characterization. *Plant Physiology and Biochemistry* 146, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.041>
- Meng, C., Yang, D., Ma, X., Zhao, W., Liang, X., Ma, N., Meng, Q., 2016. Suppression of tomato SINAC1 transcription factor delays fruit ripening. *J. Plant Physiol.* 193, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.014>
- Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., 2011. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement, in: *Breeding for fruit quality*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 81–104. <https://doi.org/10.1002/9780470959350.ch4>
- Mercado, J.A., Trainotti, L., Jiménez-Bermúdez, L., Santiago-Doménech, N., Posé, S., Donolli, R., Barceló, M., Casadoro, G., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.004>
- Merchante, C., Vallarino, J.G., Osorio, S., Aragüez, I., Villarreal, N., Ariza, M.T., Martínez, G.A., Medina-Escobar, N., Civello, M.P., Fernie, A.R., Botella, M.A., Valpuesta, V., 2013. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *J. Exp. Bot.* 64, 4421–4439. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert257>
- Merkouropoulos, G., Shirsat, A.H., 2003. The unusual *Arabidopsis* extensin gene atExt1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* 217, 356–366. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1002-y>
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., Kunst, L., 1999. CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell* 11, 825–838. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.825>
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>



- Molina-Hidalgo, F.J., Franco, A.R., Villatoro, C., Medina-Puche, L., Mercado, J.A., Hidalgo, M.A., Monfort, A., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Blanco-Portales, R., 2013. The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae. *J. Exp. Bot.* 64, 1471–1483. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers386>
- Molina-Hidalgo, F.J., Medina-Puche, L., Cañete-Gómez, C., Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Solano, R., Caballero, J.L., Rodríguez-Franco, A., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Moyano, E., Vicente, A., 2017. The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J Exp Bot* 68, 4529–4543. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx257>
- Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Bacic, A., Willats, W.G.T., 2007. High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J.* 50, 1118–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03114.x>
- Moore, J.P., Fangel, J.U., Willats, W.G.T., Vivier, M.A., 2014. Pectic- $\beta(1,4)$ -galactan, extensin and arabinogalactan-protein epitopes differentiate ripening stages in wine and table grape cell walls. *Ann. Bot.* 114, 1279–1294. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu053>
- Mori, T., Sakurai, M., Seki, M., Furusaki, S., 1994. Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 271–276. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650303>
- Moustacas, A.M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., Ricard, J., 1991. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem J* 279, 351–354. <https://doi.org/10.1042/bj2790351>
- Moustacas, A.M., Nari, J., Diamantidis, G., Noat, G., Crasnier, M., Borel, M., Ricard, J., 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 2. The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.* 155, 191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09476.x>
- Moya-León, M.A., Mattus-Araya, E., Herrera, R., 2019. Molecular events occurring during softening of strawberry fruit. *Front Plant Sci* 10, 615. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00615>
- Moyano, E., Martínez-Rivas, F.J., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F.J., Ric-Varas, P., Matas-Arroyo, A.J., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Rodríguez-Franco, A., 2018. Genome-wide analysis of the NAC transcription factor family and their expression during the development and ripening of the *Fragaria x ananassa* fruits. *PLOS ONE* 13, e0196953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196953>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mutawila, C., Stander, C., Halleen, F., Vivier, M.A., Mostert, L., 2017. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Eutypa lata* and *Trichoderma atroviride* culture filtrates: expression of defence-related genes and phenotypes. *Protoplasma* 254, 863–879. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0997-4>
- Nacry, P., Camilleri, C., Courtial, B., Caboche, M., Bouchez, D., 1998. Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* 149, 641–650.
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Opazo, M.C., Martínez, G.A., Moya-León, M.A., Civello, P.M., 2014. Expression of FaXTH1 and FaXTH2 genes in strawberry fruit. Cloning of promoter regions and effect of plant growth regulators. *Scientia Horticulturae* 165, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.035>

- Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M., Ricard, J., 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. *Eur. J. Biochem.* 155, 199–202. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09477.x>
- Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vicré-Gibouin, M., Mollet, J.C., Driouich, A., 2012. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Ann. Bot.* 110, 383–404. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs143>
- Nunan, K.J., Sims, I.M., Bacic, A., Robinson, S.P., Fincher, G.B., 1998. Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiol* 118, 783–792. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.783>
- Nuñez, A., Fishman, M.L., Fortis, L.L., Cooke, P.H., Hotchkiss, A.T., 2009. Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10951–10958. <https://doi.org/10.1021/jf902162t>
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., Kikuchi, S., 2013. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front Microbiol* 4, 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>
- Ochiai, K., Shimizu, A., Okumoto, Y., Fujiwara, T., Matoh, T., 2011. Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice. *Plant Physiol.* 156, 1457–1463. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171470>
- Ochoa-Jiménez, V.A., Berumen-Varela, G., Burgara-Estrella, A., Orozco-Avitia, J.A., Ojeda-Contreras, Á.J., Trillo-Hernández, E.A., Rivera-Domínguez, M., Troncoso-Rojas, R., Báez-Sañudo, R., Datsenka, T., Handa, A.K., Tiznado-Hernández, M.E., 2018. Functional analysis of tomato rhamnogalacturonan lyase gene Solyc11g011300 during fruit development and ripening. *J. Plant Physiol.* 231, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.001>
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., Darvill, A.G., 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science* 294, 846–849. <https://doi.org/10.1126/science.1062319>
- O'Neill, M.A., York, W.S., 2013. The composition and structure of plant primary cell walls, in: *Annual plant reviews online*. American Cancer Society, pp. 1–54. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0067>
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, S., 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10, 239–247. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.6.239>
- Oomen, R.J.F.J., Doeswijk-Voragen, C.H.L., Bush, M.S., Vincken, J.P., Borkhardt, B., van den Broek, L.A.M., Corsar, J., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., McCann, M.C., Visser, R.G.F., 2002. In muro fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development. *Plant J.* 30, 403–413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01296.x>
- Opazo, M.C., Figueroa, C.R., Henríquez, J., Herrera, R., Bruno, C., Valenzuela, P.D.T., Moya-León, M.A., 2010. Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Sci.* 179, 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.07.018>
- Opazo, M.C., Lizana, R., Pimentel, P., Herrera, R., Moya-León, M.A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.007>



- Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G.J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03398.x>
- Pabst, M., Fischl, R.M., Brecker, L., Morelle, W., Fauland, A., Köfeler, H., Altmann, F., Léonard, R., 2013. Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *Plant J.* 76, 61–72. <https://doi.org/10.1111/tpj.12271>
- Palma, J.M., Corpas, F.J., Freschi, L., Valpuesta, V., 2019. Fruit ripening: From present knowledge to future development. *Frontiers Media SA*.
- Pandolfini, T., Molesini, B., Spena, A., 2007. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci.* 12, 327–329. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.011>
- Paniagua, C., Blanco-Portales, R., Barceló-Muñoz, M., García-Gago, J.A., Waldron, K.W., Quesada, M.A., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J.A., 2016. Antisense down-regulation of the strawberry  $\beta$ -galactosidase gene Fa $\beta$ Gal4 increases cell wall galactose levels and reduces fruit softening. *J. Exp. Bot.* 67, 619–631. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv462>
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2014. Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann. Bot.* 114, 1375–1383. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu149>
- Paniagua, C., Ric-Varas, P., García-Gago, J.A., López-Casado, G., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Schüchel, J., Knox, J.P., Matas, A.J., Quesada, M.A., Posé, S., Mercado, J.A., 2020. Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. *J Exp Bot* eraa398. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa398>
- Paniagua, C., Santiago-Doménech, N., Kirby, A.R., Gunning, A.P., Morris, V.J., Quesada, M.A., Matas, A.J., Mercado, J.A., 2017. Structural changes in cell wall pectins during strawberry fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry* 118, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.001>
- Park, M.H., Suzuki, Y., Chono, M., Knox, J.P., Yamaguchi, I., 2003. CsAGP1, a gibberellin-responsive gene from cucumber hypocotyls, encodes a classical arabinogalactan protein and is involved in stem elongation. *Plant Physiol.* 131, 1450–1459. <https://doi.org/10.1104/pp.015628>
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2012. A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant Physiology* 158, 1933–1943. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192880>
- Pattison, R.J., Csukasi, F., Catalá, C., 2014. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiol Plant* 151, 62–72. <https://doi.org/10.1111/ppl.12142>
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Doco, T., 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85, 109–121. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00053-1)
- Perez-Garcia, P., Moreno-Risueno, M.A., 2018. Stem cells and plant regeneration. *Developmental Biology* 442, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.06.021>
- Perkins-Veazie, P., 1995. Growth and ripening of strawberry fruit, in: *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 267–297. <https://doi.org/10.1002/9780470650585.ch8>
- Pillet, J., Yu, H.W., Chambers, A.H., Whitaker, V.M., Folta, K.M., 2015. Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *J Exp Bot* 66, 4455–4467. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv205>

- Popper, Z.A., Fry, S.C., 2005. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. *Ann. Bot.* 96, 91–99. <https://doi.org/10.1093/aob/mci153>
- Portieles, R., Canales, E., Hernández, I., López, Y., Rodríguez, Mayra, Rodríguez, Meilyn, Terauchi, R., Borroto, C., Santos, R., Ayra-Pardo, C., Zhu, D., Liu, X., Borrás-Hidalgo, O., 2018. NmEXT extensin gene: a positive regulator of resistance response against the oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Plant Mol Biol* 36, 484-490. <https://doi.org/10.1007/s11105-018-1100-4>
- Posé, S., García-Gago, J.A., Santiago-Doménech, N., Pliego Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2011. Strawberry fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants. *Genes, Genomes and Genomics* 5, 40–48.
- Posé, S., Kirby, A.R., Mercado, J.A., Morris, V.J., Quesada, M.A., 2012. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers* 88, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>
- Posé, S., Kirby, A.R., Paniagua, C., Waldron, K.W., Morris, V.J., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2015. The nanostructural characterization of strawberry pectins in pectate lyase or polygalacturonase silenced fruits elucidates their role in softening. *Carbohydrate Polymers* 132, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.018>
- Posé, S., Paniagua, C., Cifuentes, M., Blanco-Portales, R., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2013. Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 64, 3803–3815. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert210>
- Posé, S., Paniagua, C., Matas, A.J., Gunning, A.P., Morris, V.J., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2019. A nanostructural view of the cell wall disassembly process during fruit ripening and postharvest storage by atomic force microscopy. *Trends in Food Science & Technology, Application of Atomic Force Microscopy in Food Science* 87, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.011>
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N., 2007. Fruit ripening phenomena--an overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408390600976841>
- Prasath, G.S., Subramanian, S.P., 2014. Antihyperlipidemic effect of fisetin, a bioflavonoid of strawberries, studied in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 442–449. <https://doi.org/10.1002/jbt.21583>
- Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S., Prasad, M., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 17, 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.004>
- Quesada, M.A., Blanco-Portales, R., Posé, S., García-Gago, J.A., Jiménez-Bermúdez, S., Muñoz-Serrano, A., Caballero, J.L., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A., Muñoz-Blanco, J., 2009. Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiol.* 150, 1022–1032. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138297>
- Raffaele, S., Rivas, S., Roby, D., 2006. An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 580, 3498–3504. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.027>
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20, 101–153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Redgwell, R.J., Fischer, M., Kendal, E., MacRae, E.A., 1997a. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203, 174–181. <https://doi.org/10.1007/s004250050179>

- Redgwell, R.J., MacRae, E., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., Harker, R., 1997b. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203, 162–173. <https://doi.org/10.1007/s004250050178>
- Redgwell, R.J., Melton, L.D., Brasch, D.J., 1992. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiol.* 98, 71–81. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.71>
- Ren, H., Gray, W.M., 2015. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Mol Plant* 8, 1153–1164. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.003>
- Ríos, P., Argyris, J., Vegas, J., Leida, C., Kenigswald, M., Tzuri, G., Troadec, C., Bendahmane, A., Katzir, N., Picó, B., Monforte, A.J., Garcia-Mas, J., 2017. ETHQV6.3 is involved in melon climacteric fruit ripening and is encoded by a NAC domain transcription factor. *Plant J.* 91, 671–683. <https://doi.org/10.1111/tpj.13596>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., 2013. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 75, 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.007>
- Rose, J.K.C., Hadfield, K.A., Labavitch, J.M., Bennett, A.B., 1998. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol* 117, 345–361. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.345>
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.10.002>
- Round, A.N., Rigby, N.M., MacDougall, A.J., Morris, V.J., 2010. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* 345, 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019>
- Ruan, Y.L., Patrick, J.W., Bouzayen, M., Osorio, S., Fernie, A.R., 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science* 17, 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.005>
- Sabater-Jara, A.B., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., Martínez-Esteso, M.J., Youssef, S.M., Casado-Vela, J., Vera-Urbina, J.C., Sellés-Marchart, S., Bru-Martínez, R., Pedreño, M.A., 2014. Suspension-cultured plant cells as a tool to analyze the extracellular proteome. *Methods Mol. Biol.* 1072, 407–433. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_29)
- Sablowski, R.W., Meyerowitz, E.M., 1998. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92, 93–103. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80902-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80902-2)
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39, 213–294. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70597-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70597-5)
- Sakurai, M., Mori, T., 1996. Stimulation of anthocyanin synthesis by conditioned medium produced by strawberry suspension cultures. *Journal of Plant Physiology* 149, 599–604. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80340-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80340-3)
- Sallato, B.V., Torres, R., Zoffoli, J.P., Latorre, B.A., 2007. Effect of boscalid on postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5, 67–78. <https://doi.org/10.5424/sjar/2007051-224>
- Salvatierra, A., Pimentel, P., Moya-León, M.A., Herrera, R., 2013. Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry* 90, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.016>



- Samtani, J.B., Rom, C.R., Friedrich, H., Fennimore, S.A., Finn, C.E., Petran, A., Wallace, R.W., Pritts, M.P., Fernandez, G., Chase, C.A., Kubota, C., Bergesford, B., 2019. The status and future of the strawberry industry in the United States. *HortTechnology* 29, 11–24. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04135-18>
- Sánchez-Sevilla, J.F., Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., Posé, D., Merchante, C., Botella, M.A., Amaya, I., Valpuesta, V., 2017. Gene expression atlas of fruit ripening and transcriptome assembly from RNA-seq data in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Scientific Reports* 7, 13737. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14239-6>
- Santiago-Doménech, N., Jiménez-Bemúdez, S., Matas, A.J., Rose, J.K.C., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J.A., Quesada, M.A., 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J. Exp. Bot.* 59, 2769–2779. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern142>
- Sasso, S., Ökvist, M., Roderer, K., Gamper, M., Codoni, G., Kregel, U., Kast, P., 2009. Structure and function of a complex between chorismate mutase and DAHP synthase: efficiency boost for the junior partner. *EMBO J* 28, 2128–2142. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.165>
- Sato, K., Nakayama, M., Shigeta, J., 1996. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Science (Ireland)* 113, 91–98. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)05694-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)05694-7)
- Satoh, S., 1998. Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol* 39, 361–368. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029378>
- Schaart, J.G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., van Houwelingen, A.M.M.L., de Vos, R.C.H., Jonker, H.H., Xu, W., Routaboul, J.M., Lepiniec, L., Bovy, A.G., 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *New Phytol.* 197, 454–467. <https://doi.org/10.1111/nph.12017>
- Schols, H.A., Bakx, E.J., Schipper, D., Voragen, A.G.J., 1995. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279, 265–279. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00287-1](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00287-1)
- Schulze-Lefert, P., 2004. Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.004>
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaert, J.A., McCarty, D.R., 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276, 1872–1874. <https://doi.org/10.1126/science.276.5320.1872>
- Schwieterman, M.L., Colquhoun, T.A., Jaworski, E.A., Bartoshuk, L.M., Gilbert, J.L., Tieman, D.M., Odabasi, A.Z., Moskowitz, H.R., Folta, K.M., Klee, H.J., Sims, C.A., Whitaker, V.M., Clark, D.G., 2014. Strawberry flavor: diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLoS ONE* 9, e88446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>
- Seifert, G.J., Roberts, K., 2007. The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58, 137–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103801>
- Serpe, M.D., Nothnagel, E.A., 1994. Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193, 542–550. <https://doi.org/10.1007/BF02411560>
- Serrani, J.C., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., García-Martínez, J.L., 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J.* 56, 922–934. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03654.x>
- Serrani, J.C., Sanjuán, R., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., García-Martínez, J.L., 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology* 145, 246–257. <https://doi.org/10.1104/pp.107.098335>



- Seymour, G.B., Ryder, C.D., Cevik, V., Hammond, J.P., Popovich, A., King, G.J., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Manning, K., 2011. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue\*. *J Exp Bot* 62, 1179–1188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq360>
- Shan, W., Kuang, J., Chen, L., Xie, H., Peng, H., Xiao, Y., Li, X., Chen, W., He, Q., Chen, J., Lu, W., 2012. Molecular characterization of banana NAC transcription factors and their interactions with ethylene signalling component EIL during fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 63, 5171–5187. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers178>
- Shan, W., Kuang, J.F., Wei, W., Fan, Z.Q., Deng, W., Li, Z.G., Bouzayen, M., Pirrello, J., Lu, W.J., Chen, J.Y., 2020. MaXB3 modulates MaNAC2, MaACS1, and MaACO1 stability to repress ethylene biosynthesis during banana fruit ripening. *Plant Physiol* 184, 1153–1171. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00313>
- Shao, H., Wang, H., Tang, X., 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00902>
- Sharathchandra, R.G., Stander, C., Jacobson, D., Ndimba, B., Vivier, M.A., 2011. Proteomic analysis of grape berry cell cultures reveals that developmentally regulated ripening related processes can be studied using cultured cells. *PLoS ONE* 6, e14708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014708>
- Sharma, R.M., Yamdagni, R., Dubey, A.K., Pandey, V., 2019. Strawberries: Production, Postharvest Management and Protection. CRC Press 548.
- Silva, I.R., Jers, C., Meyer, A.S., Mikkelsen, J.D., 2016. Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnology* 33, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.07.008>
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., Maule, A.J., 2009. An Arabidopsis GPI-Anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21, 581–594. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060145>
- Simpson, D., 2018. The economic importance of strawberry crops, in: Hytönen, T., Graham, J., Harrison, R. (Eds.), *The genomes of rosaceous berries and their wild relatives, compendium of plant genomes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–7. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9_1)
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J., 2015. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci* 16, 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Smith, D.L., Abbott, J.A., Gross, K.C., 2002. Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol.* 129, 1755–1762. <https://doi.org/10.1104/pp.011025>
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- 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. *J. Exp. Bot.* 54, 271–277. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg025>
- Stanton, H., Golub, S.B., Rogerson, F.M., Last, K., Little, C.B., Fosang, A.J., 2011. Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nature Protocols* 6, 388–404. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.179>
- Staudt, G., 2009. Strawberry biogeography, genetics and systematics. *Acta Horticulturae* 842, 71–83. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.842.1>



- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.M., 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.047>
- Sun, J.H., Luo, J.J., Tian, L., Li, C.L., Xing, Y., Shen, Y.Y., 2013. New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening. *J Plant Growth Regul* 32, 461–470. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9312-6>
- Sun, W., Kieliszewski, M.J., Showalter, A.M., 2004. Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *Plant J.* 40, 870–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02274.x>
- SunEun, A., AhYoun, L., MaoHua, W., YongSoo, H., 2014. Increase of strawberry fruit shelf-life through preharvest spray of calcium-chitosan and post-harvest treatment with high pressure CO<sub>2</sub>. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 32, 636–644.
- Symons, G.M., Chua, Y.J., Ross, J.J., Quittenden, L.J., Davies, N.W., Reid, J.B., 2012. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J. Exp. Bot.* 63, 4741–4750. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers147>
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A., McCarty, D.R., 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12235–12240. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.12235>
- Tax, F.E., Vernon, D.M., 2001. T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiol.* 126, 1527–1538. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1527>
- Thompson, J.E., Fry, S.C., 2000. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, 275–286. <https://doi.org/10.1007/s004250000287>
- Thompson, P.A., 1969. The effect of applied growth substances on development of the strawberry fruit. II. Interactions of auxins and gibberellins. *Journal of Experimental Botany* 20, 629–647. <https://doi.org/10.1093/jxb/20.3.629>
- Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., Casadoro, G., 2001. beta-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J. Exp. Bot.* 52, 1635–1645. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.361.1635>
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L., 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 28, 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J., 2006. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314, 1298–1301. <https://doi.org/10.1126/science.1133649>
- Ünal, M.Ü., Şener, A., 2015. Extraction and characterization of pectin methylesterase from Alyanak apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J Food Sci Technol* 52, 1194–1199. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1099-3>
- Valenzuela-Riffo, F., Gaete-Eastman, C., Stappung, Y., Lizana, R., Herrera, R., Moya-León, M.A., Morales-Quintana, L., 2019. Comparative in silico study of the differences in the structure and ligand interaction properties of three alpha-expansin proteins from *Fragaria chiloensis* fruit. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 37, 3245–3258. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1517610>
- Valenzuela-Riffo, F., Parra-Palma, C., Ramos, P., Morales-Quintana, L., 2020. Molecular and structural insights into FaEXPA5, an alpha-expansin protein related with cell wall disassembly during ripening of strawberry fruit. *Plant Physiol Biochem* 154, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.010>



- Vallarino, J.G., de Abreu E Lima, F., Soria, C., Tong, H., Pott, D.M., Willmitzer, L., Fernie, A.R., Nikoloski, Z., Osorio, S., 2018. Genetic diversity of strawberry germplasm using metabolomic biomarkers. *Sci Rep* 8, 14386. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32212-9>
- Vallarino, J.G., Merchante, C., Sánchez-Sevilla, J.F., Balaguer, M.A. de L., Pott, D.M., Ariza, M.T., Casañal, A., Posé, D., Vioque, A., Amaya, I., Willmitzer, L., Solano, R., Sozzani, R., Fernie, A.R., Botella, M.A., Giovannoni, J.J., Valpuesta, V., Osorio, S., 2019. Characterizing the involvement of FaMADS9 in the regulation of strawberry fruit receptacle development. *Plant Biotechnology Journal* 18, 929–943. <https://doi.org/10.1111/pbi.13257>
- Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., Casañal, A., Cruz-Rus, E., Sánchez-Sevilla, J.F., Amaya, I., Gialvalisco, P., Fernie, A.R., Botella, M.A., Valpuesta, V., 2015. Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytol.* 208, 482–496. <https://doi.org/10.1111/nph.13463>
- Verherbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., Knox, J.P., 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* 344, 1858–1862. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.11.010>
- Vicente, A.R., Ortugno, C., Powell, A.L.T., Greve, L.C., Labavitch, J.M., 2007. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 4119–4124. <https://doi.org/10.1021/jf063547r>
- Villarreal, N.M., Bustamante, C.A., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2010. Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *J. Sci. Food Agric.* 90, 683–689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3868>
- Villarreal, N.M., Marina, M., Nardi, C.F., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2016. Novel insights of ethylene role in strawberry cell wall metabolism. *Plant Sci.* 252, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.018>
- Vincken, J., Schols, H.A., Oomen, R.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G., Visser, R.G., 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiol* 132, 1781–1789.
- Vogg, G., Fischer, S., Leide, J., Emmanuel, E., Jetter, R., Levy, A.A., Riederer, M., 2004. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *J. Exp. Bot.* 55, 1401–1410. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh149>
- Voragen, F., Beldman, G., Schols, H., 2008. Chemistry and enzymology of pectins, in: *Advanced dietary fibre technology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 379–398. <https://doi.org/10.1002/9780470999615.ch33>
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., Giovannoni, J., 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* 296, 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.1068181>
- Wang, D., Yeats, T.H., Uluisik, S., Rose, J.K.C., Seymour, G.B., 2018. Fruit softening: revisiting the role of pectin. *Trends Plant Sci.* 23, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>
- Wang, H., Jiang, C., Wang, C., Yang, Y., Yang, L., Gao, X., Zhang, H., 2015. Antisense expression of the fasciclin-like arabinogalactan protein FLA6 gene in *Populus* inhibits expression of its homologous genes and alters stem biomechanics and cell wall composition in transgenic trees. *J Exp Bot* 66, 1291–1302. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru479>

- Wang, H., Yang, C., Zhang, C., Wang, N., Lu, D., Wang, J., Zhang, S., Wang, Z.X., Ma, H., Wang, X., 2011. Dual role of BK1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev. Cell* 21, 825–834. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.018>
- Wang, H., Zhang, H., Yang, Y., Li, M., Zhang, Y., Liu, J., Dong, J., Li, J., Butelli, E., Xue, Z., Wang, A., Wang, G., Martin, C., Jin, W., 2019. The control of red colour by a family of MYB transcription factors in octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *Plant Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1111/pbi.13282>
- Wang, H.Y., Wang, J., Gao, P., Jiao, G.L., Zhao, P.M., Li, Y., Wang, G.L., Xia, G.X., 2009. Down-regulation of GhADF1 gene expression affects cotton fibre properties. *Plant Biotechnol. J.* 7, 13–23. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00367.x>
- Wang, R., Tavano, E.C. da R., Lammers, M., Martinelli, A.P., Angenent, G.C., Maagd, R.A. de, 2019. Re-evaluation of transcription factor function in tomato fruit development and ripening with CRISPR/Cas9-mutagenesis. *Sci Rep* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38170-6>
- Wang, S.Y., Gao, H., 2013. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x aranassa* Duch.). *Food Science and Technology, Strawberries* 52, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.003>
- Wang, T., Hong, M., 2016. Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *J. Exp. Bot.* 67, 503–514. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv416>
- Wang, T., Park, Y.B., Cosgrove, D.J., Hong, M., 2015. Cellulose-Pectin spatial contacts are inherent to never-dried arabidopsis primary cell walls: evidence from solid-state nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol.* 168, 871–884. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00665>
- Wang, T., Zabolina, O., Hong, M., 2012. Pectin-cellulose interactions in the Arabidopsis primary cell wall from two-dimensional magic-angle-spinning solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 51, 9846–9856. <https://doi.org/10.1021/bi3015532>
- Wang, X., Basnayake, B.M.V.S., Zhang, H., Li, G., Li, W., Virk, N., Mengiste, T., Song, F., 2009. The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1227–1238. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-10-1227>
- Wang, Y., Ding, G., Gu, T., Ding, J., Li, Y., 2017. Bioinformatic and expression analyses on carotenoid dioxygenase genes in fruit development and abiotic stress responses in *Fragaria vesca*. *Mol. Genet. Genomics* 292, 895–907. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1321-5>
- Wang, Y., Zhang, J., Cui, W., Guan, C., Mao, W., Zhang, Z., 2017. Improvement in fruit quality by overexpressing miR399a in woodland strawberry. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7361–7370. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01687>
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* 2, 505–513. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00153-3)
- Ward, G., Nussinovitch, A., 1996. Gloss properties and surface morphology relationships of fruits. *Journal of Food Science* 61, 973–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10914.x>

- Waters, B.M., Uauy, C., Dubcovsky, J., Grusak, M.A., 2009. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 60, 4263–4274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp257>
- Wei, L., Mao, W., Jia, M., Xing, S., Ali, U., Zhao, Y., Chen, Y., Cao, M., Dai, Z., Zhang, K., Dou, Z., Jia, W., Li, B., 2018. FaMYB44.2, a transcriptional repressor, negatively regulates sucrose accumulation in strawberry receptacles through interplay with FaMYB10. *J. Exp. Bot.* 69, 4805–4820. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery249>
- Weijers, D., Wagner, D., 2016. Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annu Rev Plant Biol* 67, 539–574. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112122>
- Whitaker, V.M., Knapp, S.J., Hardigan, M.A., Edger, P.P., Slovin, J.P., Bassil, N.V., Hytönen, T., Mackenzie, K.K., Lee, S., Jung, S., Main, D., Barbey, C.R., Verma, S., 2020. A roadmap for research in octoploid strawberry. *Hortic Res* 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0252-1>
- Whitcombe, A.J., O'Neill, M.A., Steffan, W., Albersheim, P., Darvill, A.G., 1995. Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr. Res.* 271, 15–29. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00002-w](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00002-w)
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Wu, Y.Y., Liu, X.F., Fu, B.L., Zhang, Q.Y., Tong, Y., Wang, J., Wang, W.Q., Grierson, D., Yin, X.R., 2020. Methyl jasmonate enhances ethylene synthesis in Kiwifruit by Inducing NAC genes that activate ACS1. *J. Agric. Food Chem.* 68, 3267–3276. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07379>
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N.H., 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* 14, 3024–3036. <https://doi.org/10.1101/gad.852200>
- Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M., Chua, N.H., 2002. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* 419, 167–170. <https://doi.org/10.1038/nature00998>
- Xie, Y.G., Ma, Y.Y., Bi, P.P., Wei, W., Liu, J., Hu, Y., Gou, Y.J., Zhu, D., Wen, Y.Q., Feng, J.Y., 2020. Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. *Plant Physiology and Biochemistry* 146, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.004>
- Xiong, L., Zhu, J.K., 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133, 29–36. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025395>
- Xue, C., Guan, S.C., Chen, J.Q., Wen, C.J., Cai, J.F., Chen, X., 2020. Genome wide identification and functional characterization of strawberry pectin methylesterases related to fruit softening. *BMC Plant Biol* 20. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2225-9>
- Yahia, E.M., Carrillo-Lopez, A., 2018. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. Woodhead Publishing. ISBN: 9780128132784
- Yapo, B.M., 2011. Rhamnogalacturonan-I: A structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews* 51, 391–413. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.615962>
- Ye, Y., Wu, K., Chen, J., Liu, Q., Wu, Y., Liu, B., Fu, X., 2018. OsSND2, a NAC family transcription factor, is involved in secondary cell wall biosynthesis through regulating MYBs expression in rice. *Rice* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0228-z>

- Yi, S.Y., Shirasu, K., Moon, J.S., Lee, S.G., Kwon, S.Y., 2014. The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-Triggered oxidative burst and callose deposition. *PLOS ONE* 9, e88951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088951>
- Yong, Y., Zhang, Y., Lyu, Y., 2019. A Stress-Responsive NAC transcription factor from Tiger Lily (LINAC2) interacts with LIDREB1 and LIZHFD4 and enhances various abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133225>
- Yu, M.H., Zhao, Z.Z., He, J.X., 2018. Brassinosteroid signaling in plant-microbe interactions. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19124091>
- Yuan, X., Wang, H., Cai, J., Li, D., Song, F., 2019. NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathol Res* 1, 3. <https://doi.org/10.1186/s42483-018-0008-0>
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., Sun, T.P., 2007. Global analysis of the direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 3037–3057. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054999>
- Zhang, J., Zhang, Y., Dou, Y., Li, W., Wang, S., Shi, W., Sun, Y., Zhang, Z., 2017. Single nucleotide mutation in FvMYB10 may lead to the yellow fruit in *Fragaria vesca*. *Mol Breeding* 37, 35. <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0625-9>
- Zhang, Q., Feng, C., Li, W., Qu, Z., Zeng, M., Xi, W., 2019. Transcriptional regulatory networks controlling taste and aroma quality of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit during ripening. *BMC Genomics* 20, 45. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5424-8>
- Zhang, S., Chen, Y., Zhao, L., Li, C., Yu, J., Li, T., Yang, W., Zhang, Shengnan, Su, H., Wang, L., 2020. A novel NAC transcription factor, MdNAC42, regulates anthocyanin accumulation in red-fleshed apple by interacting with MdMYB10. *Tree Physiol.* 40, 413–423. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa004>
- Zhang, W., Furusaki, S., 1997. Regulation of anthocyanin synthesis in suspension cultures of strawberry cell by pH. *Biotechnology Letters* 19, 1057–1061. <https://doi.org/10.1023/A:1018472006468>
- Zhang, W., Seki, M., Furusaki, S., Middelberg, A.P.J., 1998. Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86, 72–78. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80037-8)
- Zhang, W.W., Zhao, S.Q., Zhang, L.C., Xing, Y., Jia, W.S., 2020. Changes in the cell wall during fruit development and ripening in *Fragaria vesca*. *Plant Physiology and Biochemistry* 154, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.028>
- Zhang, Y., Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L., Heber, D., 2008. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 670–675. <https://doi.org/10.1021/jf071989c>
- Zhao, Y., Zhang, Z., Gao, J., Wang, P., Hu, T., Wang, Z., Hou, Y.J., Wan, Y., Liu, W., Xie, S., Lu, T., Xue, L., Liu, Y., Macho, A.P., Tao, W.A., Bressan, R.A., Zhu, J.K., 2018. Arabidopsis duodecuple mutant of PYL ABA receptors reveals PYL repression of ABA-independent SnRK2 activity. *Cell Reports* 23, 3340–3351.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.044>
- Zhou, H., Lin-Wang, K., Wang, H., Gu, C., Dare, A.P., Espley, R.V., He, H., Allan, A.C., Han, Y., 2015. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *Plant J.* 82, 105–121. <https://doi.org/10.1111/tpj.12792>
- Zhu, F., Luo, T., Liu, C., Wang, Y., Zheng, L., Xiao, X., Zhang, M., Yang, H., Yang, W., Xu, R., Zeng, Y., Ye, J., Xu, Juan, Xu, Jianguo, Larkin, R.M., Wang, P., Wen, W., Deng, X., Fernie, A.R., Cheng, Y., 2020. A NAC transcription factor and its interaction protein hinder abscisic acid biosynthesis by synergistically repressing NCED5 in *Citrus reticulata*. *J. Exp. Bot.* 71, 3613–3625. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa118>

- Zhu, M., Chen, G., Zhou, S., Tu, Y., Wang, Y., Dong, T., Hu, Z., 2014. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. *Plant Cell Physiol.* 55, 119–135. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct162>
- Zou, B., Yang, D.L., Shi, Z., Dong, H., Hua, J., 2014. Monoubiquitination of histone 2B at the disease resistance gene locus regulates its expression and impacts immune responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 165, 309–318. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227801>
- Zykwinska, A.W., Ralet, M.C.J., Garnier, C.D., Thibault, J.F.J., 2005. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.* 139, 397–407. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065912>



# ANEXO

Tabla Suplementaria 2.1: Lista de cebadores usados.

qPCR <i>FaNAC2</i>	Fw: 5'- GACTCGTCTTCCGGCTCG -3' Rv: 5'- CTTTTGGGGGCTTTCCTCTGT -3'
qPCR <i>FaNAC3</i>	Fw: 5'- AGCTGAGATTGCCTCCTGGT -3' Rv: 5'- TGGCTTTGGGTAGTGGAGTT -3'
<i>NDR1</i>	Fw: 5'- CGG AAT TGT GGT CGG AGA AAA CGC TGT -3' Rv: 5'- TCC TCA TGG ATT GCT CCC CCT TTC ATT -3'
<i>M13</i>	Fw: 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3' Rv: 5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G -3'
Pro500 Pro501	Fw: 5' GCG TTT GGA ATC ACT ACA GG 3' Rv: 5' AAC CTC TGG CGA AGA AGT CC 3'

Tabla Suplementaria 2.2: Composición de solución de aminoácidos 10X usada en el medio de cultivo de las levaduras.

Componente	Concentración (mg/L)	Número catálogo Sigma
L-Isoleucina	300	I 2752
L-Valina	1500	V 0500
L-Adenina hemisulfatada	200	A 9126
L-Arginina HCl	200	A 5131
L-Histidina HCl monohidratada	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

Tabla Suplementaria 2.3: Lista de genes sobreexpresados en los frutos de la línea 11 FaNAC2 con  $\log_2$  de fold change de al menos 1,5. Se indica el identificador de del gen, el p-valor ajustado por el método de Benjamini and Hochberg y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj
FvH4_1g09170.1	5,70	2,5784E-13	FvH4_6g08640.1	2,31	1,6971E-16	FvH4_5g17770.1	1,80	6,5074E-12
FvH4_5g29210.1	5,53	3,3421E-16	FvH4_6g19430.1	2,30	0,00019644	FvH4_6g03790.1	1,80	4,2796E-10
FvH4_1g29340.1	5,16	2,0091E-14	FvH4_6g49300.1	2,29	1,1075E-17	FvH4_1g30140.1	1,80	0,017137
FvH4_1g09560.1	5,06	0,00005028	FvH4_6g15840.1	2,29	1,7947E-17	FvH4_1g17080.1	1,80	7,7221E-08
FvH4_7g30000.1	4,93	2,0343E-07	FvH4_6g54420.1	2,29	2,9419E-05	FvH4_7g24350.1	1,80	0,00039421
FvH4_6g18200.1	4,93	6,2089E-23	FvH4_6g41880.1	2,29	0,011231	FvH4_4g21380.1	1,80	1,2138E-06
FvH4_7g20220.1	4,81	0,02826	FvH4_2g15900.1	2,28	7,6835E-06	FvH4_6g12450.1	1,79	5,5172E-13
FvH4_6g44470.1	4,54	5,3185E-36	FvH4_6g53990.1	2,27	1,5166E-23	FvH4_3g38270.1	1,79	0,0015271
FvH4_3g35700.1	4,50	0,029487	FvH4_5g35540.1	2,26	3,5019E-11	FvH4_3g28710.1	1,79	0,0091457
FvH4_6g17470.1	4,46	1,2408E-67	FvH4_1g19790.1	2,25	1,1027E-14	FvH4_3g23270.1	1,79	0,00015066
FvH4_3g06030.1	4,44	0,003201	FvH4_6g19560.1	2,25	0,0041344	FvH4_5g36220.1	1,79	1,0945E-10
FvH4_4g14440.1	4,31	6,2089E-23	FvH4_4g22830.1	2,25	0,00056208	FvH4_3g32260.1	1,79	6,0817E-16
FvH4_3g31240.1	4,29	7,7221E-08	FvH4_7g16150.1	2,25	2,1385E-16	FvH4_4g25080.1	1,79	7,9022E-05
FvH4_6g10800.1	4,22	1,7906E-11	FvH4_2g10390.1	2,24	4,841E-16	FvH4_4g23750.1	1,79	1,7013E-11
FvH4_3g35240.1	4,20	0,037126	FvH4_3g11650.1	2,23	5,2892E-06	FvH4_7g32570.1	1,78	1,0593E-14
FvH4_2g18850.1	4,19	1,3422E-07	FvH4_6g48450.1	2,22	6,7941E-13	FvH4_3g19190.1	1,78	2,7077E-15
FvH4_2g00150.1	4,11	0,014919	FvH4_1g21470.1	2,22	0,0048317	FvH4_3g09930.1	1,78	7,6267E-06
FvH4_6g05920.1	4,07	0,00043944	FvH4_3g01740.1	2,22	1,566E-08	FvH4_3g11410.1	1,78	0,00068273
FvH4_7g25570.1	4,06	5,0946E-41	FvH4_3g38140.1	2,21	1,7576E-05	FvH4_2g41060.1	1,78	6,9436E-11
FvH4_5g18320.1	4,00	4,1736E-05	FvH4_7g14070.1	2,21	0,0092891	FvH4_7g24060.1	1,78	9,0243E-06
FvH4_2g28920.1	3,94	1,3612E-07	FvH4_6g52190.1	2,20	0,0052721	FvH4_1g14780.1	1,78	0,00021647
FvH4_3g05430.1	3,85	0,041732	FvH4_5g10980.1	2,20	1,9511E-11	FvH4_4g04650.1	1,78	0,0075823
FvH4_3g43540.1	3,79	2,0514E-18	FvH4_4g33890.1	2,20	6,0817E-16	FvH4_6g16750.1	1,78	0,00026417
FvH4_6g45150.1	3,79	7,1116E-55	FvH4_5g33810.1	2,20	8,71E-07	FvH4_3g43250.1	1,78	1,2679E-15
FvH4_7g28850.1	3,78	3,2022E-07	FvH4_5g28820.1	2,19	4,8282E-18	FvH4_2g10990.1	1,77	0,00077014
FvH4_2g31320.1	3,72	3,9171E-09	FvH4_4g22240.1	2,19	2,2264E-08	FvH4_3g37660.1	1,77	0,007676
FvH4_4g02370.1	3,70	2,0036E-11	FvH4_4g32190.1	2,18	4,4518E-08	FvH4_5g11760.1	1,77	2,3123E-10
FvH4_4g02430.1	3,69	1,0122E-15	FvH4_7g15740.1	2,17	4,0312E-08	FvH4_4g25460.1	1,76	0,010759
FvH4_2g34060.1	3,69	1,9936E-11	FvH4_4g34890.1	2,17	0,0001936	FvH4_6g38290.1	1,76	0,00016662
FvH4_2g39130.1	3,68	5,8382E-46	FvH4_5g30940.1	2,17	1,3551E-10	FvH4_4g30310.1	1,76	0,001891
FvH4_6g04040.1	3,67	0,010566	FvH4_2g25990.1	2,17	0,0003724	FvH4_6g18430.1	1,75	0,00106
FvH4_7g09170.1	3,64	0,011215	FvH4_6g40150.1	2,16	1,1596E-09	FvH4_5g14010.1	1,75	1,4657E-05
FvH4_3g21130.1	3,59	5,0304E-41	FvH4_4g25860.1	2,16	0,0066794	FvH4_5g36850.1	1,74	2,4187E-11
FvH4_4g12960.1	3,47	5,1632E-11	FvH4_3g07830.1	2,16	5,9212E-13	FvH4_6g20150.1	1,74	0,00017067
FvH4_1g08080.1	3,47	0,00052215	FvH4_3g12580.1	2,15	2,5E-08	FvH4_4g26950.1	1,74	0,033216
FvH4_2g38500.1	3,45	0,0078505	FvH4_2g21690.1	2,15	0,00018157	FvH4_6g49550.1	1,74	3,0586E-12
FvH4_7g05770.1	3,43	0,0014259	FvH4_7g12120.1	2,15	1,0788E-08	FvH4_6g15850.1	1,73	1,0647E-14
FvH4_6g47290.1	3,42	8,9901E-08	FvH4_3g24520.1	2,15	0,00026137	FvH4_3g00750.1	1,73	3,5851E-13
FvH4_5g37220.1	3,40	0,014261	FvH4_5g39300.1	2,15	0,0010065	FvH4_3g40860.1	1,73	1,2755E-11
FvH4_4g20180.1	3,39	6,0061E-28	FvH4_6g31970.1	2,15	1,6206E-14	FvH4_2g17700.1	1,73	6,363E-06
FvH4_6g37460.1	3,37	1,4844E-35	FvH4_5g36910.1	2,14	1,9367E-18	FvH4_4g01680.1	1,73	5,3981E-05
FvH4_6g43500.1	3,33	9,252E-20	FvH4_2g04680.1	2,14	2,8633E-22	FvH4_1g06510.1	1,72	0,043473
FvH4_1g24530.1	3,33	3,7691E-21	FvH4_6g11660.1	2,14	0,002106	FvH4_6g34360.1	1,72	4,2318E-11
FvH4_4g06860.1	3,31	0,046526	FvH4_7g25330.1	2,14	5,9717E-13	FvH4_1g19810.1	1,72	0,016035
FvH4_5g26560.1	3,30	0,00034614	FvH4_1g10660.1	2,14	2,6525E-05	FvH4_3g16140.1	1,71	2,3976E-11
FvH4_1g18550.1	3,30	4,1835E-41	FvH4_2g01010.1	2,14	0,018094	FvH4_6g21660.1	1,71	0,0016869
FvH4_3g17050.1	3,30	1,341E-12	FvH4_2g31700.1	2,13	2,7021E-06	FvH4_3g04760.1	1,71	0,00003193
FvH4_2g39150.1	3,29	1,1987E-07	FvH4_2g18220.1	2,13	0,012003	FvH4_4g14260.1	1,71	0,00040179
FvH4_2g28580.1	3,27	5,0583E-07	FvH4_4g24820.1	2,12	0,025592	FvH4_1g27450.1	1,70	6,7063E-05
FvH4_3g31910.1	3,26	0,042889	FvH4_4g30270.1	2,12	0,039024	FvH4_6g32100.1	1,70	2,2165E-09
FvH4_5g20740.1	3,23	0,030748	FvH4_7g26000.1	2,10	1,9367E-18	FvH4_6g31740.1	1,70	0,0083641
FvH4_7g22910.1	3,22	5,5725E-40	FvH4_5g15150.1	2,10	0,0059148	FvH4_5g16380.1	1,70	3,93E-13
FvH4_6g44460.1	3,15	2,3989E-22	FvH4_7g24720.1	2,10	1,4778E-06	FvH4_4g16110.1	1,70	0,0065874
FvH4_7g02720.1	3,12	0,00071672	FvH4_4g15300.1	2,10	0,024826	FvH4_7g15190.1	1,69	8,3648E-07
FvH4_3g29030.1	3,10	0,014475	FvH4_5g25310.1	2,09	0,00022164	FvH4_4g22840.1	1,69	1,1472E-06
FvH4_6g07300.1	3,07	1,8415E-40	FvH4_3g06200.1	2,09	3,1522E-13	FvH4_6g38150.1	1,69	1,6951E-12
FvH4_4g31300.1	3,04	2,7234E-17	FvH4_4g28270.1	2,09	0,032562	FvH4_2g37650.1	1,69	6,8905E-05
FvH4_5g38120.1	3,02	0,034585	FvH4_3g37410.1	2,09	4,8284E-10	FvH4_5g00120.1	1,69	0,02085
FvH4_3g01620.1	3,01	3,4978E-18	FvH4_1g21040.1	2,08	5,7905E-15	FvH4_4g31070.1	1,68	4,3762E-13

FvH4_6g12870.1	2,96	5,2218E-10	FvH4_4g36510.1	2,08	7,5589E-17	FvH4_5g00300.1	1,68	0,00003021
FvH4_7g13190.1	2,87	0,00013522	FvH4_5g05610.1	2,08	0,0039737	FvH4_5g38240.1	1,68	0,042601
FvH4_6g43580.1	2,87	5,205E-07	FvH4_4g24770.1	2,08	3,2143E-17	FvH4_4g30030.1	1,68	0,01636
FvH4_4g29460.1	2,86	9,1223E-14	FvH4_7g19270.1	2,07	4,0047E-06	FvH4_7g29440.1	1,68	3,8066E-13
FvH4_7g06230.1	2,86	0,0078646	FvH4_1g10380.1	2,07	0,024646	FvH4_2g02490.1	1,68	0,00051253
FvH4_6g43640.1	2,86	0,0017352	FvH4_6g11940.1	2,06	0,00062534	FvH4_2g32060.1	1,68	0,0073852
FvH4_6g41130.1	2,86	9,6562E-06	FvH4_6g14770.1	2,05	3,2072E-08	FvH4_6g31420.1	1,68	0,0026243
FvH4_5g11700.1	2,80	9,5382E-06	FvH4_3g20040.1	2,05	3,5705E-10	FvH4_1g14430.1	1,68	8,9901E-08
FvH4_2g06610.1	2,79	8,9901E-08	FvH4_1g20410.1	2,05	8,9571E-10	FvH4_1g15170.1	1,68	0,00025084
FvH4_3g00510.1	2,79	4,6467E-06	FvH4_6g06430.1	2,04	2,9398E-18	FvH4_4g25560.1	1,67	0,00044074
FvH4_6g02140.1	2,78	6,2555E-06	FvH4_6g43200.1	2,04	0,014005	FvH4_2g29470.1	1,67	0,042025
FvH4_4g11920.1	2,78	4,0286E-05	FvH4_6g49150.1	2,03	1,8016E-17	FvH4_3g44780.1	1,66	1,372E-06
FvH4_6g39690.1	2,75	0,00084203	FvH4_7g17080.1	2,02	3,0923E-13	FvH4_3g30750.1	1,66	7,0508E-11
FvH4_5g32820.1	2,75	0,0002987	FvH4_6g40950.1	2,02	9,1223E-14	FvH4_2g34560.1	1,66	4,6814E-05
FvH4_5g03710.1	2,75	3,5555E-25	FvH4_6g27610.1	2,02	1,0745E-07	FvH4_5g12090.1	1,65	0,036601
FvH4_2g34030.1	2,75	0,004404	FvH4_3g45310.1	2,02	9,1467E-06	FvH4_4g22090.1	1,65	1,8597E-10
FvH4_4g29940.1	2,75	0,038016	FvH4_2g29830.1	2,01	0,016937	FvH4_6g40280.1	1,65	3,2069E-10
FvH4_2g39750.1	2,73	0,0018978	FvH4_3g24560.1	2,01	0,00024378	FvH4_1g05770.1	1,64	1,7263E-06
FvH4_1g16990.1	2,73	0,0009868	FvH4_7g01410.1	2,01	8,0622E-08	FvH4_2g06060.1	1,64	0,043454
FvH4_5g35170.1	2,73	6,7679E-06	FvH4_1g19530.1	2,01	0,011213	FvH4_1g04150.1	1,64	1,5521E-05
FvH4_1g10910.1	2,73	2,7998E-22	FvH4_5g25990.1	2,01	2,2402E-05	FvH4_5g31310.1	1,64	0,042783
FvH4_2g01690.1	2,71	0,0036803	FvH4_5g36930.1	2,01	3,3896E-15	FvH4_3g22890.1	1,63	0,00018216
FvH4_7g09180.1	2,70	1,9933E-12	FvH4_1g15780.1	2,00	0,00029348	FvH4_6g43860.1	1,63	0,00020262
FvH4_3g03940.1	2,69	1,9646E-13	FvH4_2g29840.1	2,00	3,0189E-16	FvH4_7g19750.1	1,63	0,0028592
FvH4_6g40970.1	2,68	4,903E-06	FvH4_3g03780.1	1,99	0,0000292	FvH4_6g45860.1	1,63	8,6991E-07
FvH4_7g22000.1	2,66	1,0351E-11	FvH4_1g12450.1	1,99	0,00027893	FvH4_4g24790.1	1,63	2,0083E-05
FvH4_4g17250.1	2,63	1,6562E-10	FvH4_7g15680.1	1,99	2,6299E-17	FvH4_1g19540.1	1,63	0,00044158
FvH4_6g20510.1	2,63	1,8683E-14	FvH4_4g26890.1	1,98	1,6325E-05	FvH4_4g24660.1	1,62	0,0094712
FvH4_5g03550.1	2,62	1,0078E-05	FvH4_2g25280.1	1,96	7,1503E-10	FvH4_5g16800.1	1,62	0,046174
FvH4_1g29940.1	2,62	1,7974E-14	FvH4_7g07750.1	1,96	0,00050533	FvH4_6g34980.1	1,62	1,0757E-06
FvH4_2g37890.1	2,61	1,9034E-10	FvH4_3g28430.1	1,96	7,8842E-11	FvH4_2g29070.1	1,62	0,00063801
FvH4_3g03640.1	2,61	0,032318	FvH4_7g11320.1	1,96	6,9321E-11	FvH4_6g29800.1	1,62	2,3048E-12
FvH4_7g08590.1	2,60	5,2462E-09	FvH4_5g14860.1	1,96	1,0593E-07	FvH4_4g34130.1	1,62	0,0088637
FvH4_3g21230.1	2,60	0,0032563	FvH4_3g05680.1	1,95	2,2306E-12	FvH4_3g16520.1	1,61	7,5846E-12
FvH4_4g24680.1	2,58	1,3978E-06	FvH4_3g06380.1	1,95	0,017314	FvH4_5g25150.1	1,61	0,031181
FvH4_7g27540.1	2,58	7,2489E-09	FvH4_6g39820.1	1,95	0,0031923	FvH4_4g23670.1	1,61	5,2218E-10
FvH4_2g31400.1	2,57	1,2846E-10	FvH4_7g11550.1	1,95	1,5643E-13	FvH4_7g05650.1	1,60	2,1005E-07
FvH4_3g28220.1	2,54	0,0013001	FvH4_7g01310.1	1,94	3,6257E-05	FvH4_4g16950.1	1,60	7,4847E-07
FvH4_7g07800.1	2,53	3,0424E-06	FvH4_2g16000.1	1,94	1,0171E-16	FvH4_7g26810.1	1,59	0,021434
FvH4_3g28040.1	2,50	1,1464E-24	FvH4_2g16110.1	1,94	1,2909E-13	FvH4_2g23570.1	1,59	0,00034574
FvH4_7g25110.1	2,49	1,4252E-07	FvH4_3g21270.1	1,94	1,0636E-11	FvH4_1g03420.1	1,59	2,4005E-05
FvH4_5g03020.1	2,49	0,0060734	FvH4_1g14480.1	1,94	1,3186E-06	FvH4_7g11060.1	1,59	2,4397E-06
FvH4_1g16030.1	2,49	8,444E-21	FvH4_2g16740.1	1,94	7,6288E-09	FvH4_2g01740.1	1,59	2,8828E-09
FvH4_6g27940.1	2,47	3,5825E-19	FvH4_6g26680.1	1,93	1,0681E-10	FvH4_4g34630.1	1,59	5,1509E-07
FvH4_6g08340.1	2,47	0,00063183	FvH4_4g16090.1	1,93	1,1791E-07	FvH4_6g28070.1	1,59	0,00234
FvH4_2g01660.1	2,46	7,8343E-05	FvH4_3g00840.1	1,93	1,4531E-16	FvH4_5g36590.1	1,58	2,1116E-08
FvH4_3g22430.1	2,46	4,6493E-12	FvH4_7g29740.1	1,93	0,019253	FvH4_5g31360.1	1,58	0,0001747
FvH4_4g24210.1	2,46	1,4814E-11	FvH4_6g39640.1	1,92	2,0998E-11	FvH4_7g00280.1	1,58	1,3937E-10
FvH4_3g45520.1	2,45	1,8238E-07	FvH4_5g08000.1	1,92	0,0026864	FvH4_5g33420.1	1,58	6,1949E-06
FvH4_6g26650.1	2,45	1,1262E-08	FvH4_7g12070.1	1,92	0,0010356	FvH4_6g34220.1	1,58	2,7674E-06
FvH4_6g52680.1	2,45	1,3512E-05	FvH4_7g07310.1	1,91	0,002166	FvH4_1g08770.1	1,58	0,00002367
FvH4_3g21890.1	2,45	2,6256E-11	FvH4_2g39270.1	1,91	2,7236E-12	FvH4_5g29050.1	1,57	2,5738E-08
FvH4_2g32230.1	2,45	0,014169	FvH4_2g36610.1	1,91	0,00025086	FvH4_4g24800.1	1,57	3,1084E-07
FvH4_1g19800.1	2,44	7,8592E-07	FvH4_5g20840.1	1,90	1,8984E-15	FvH4_4g19330.1	1,57	0,042732
FvH4_3g00270.1	2,44	0,0012193	FvH4_7g25400.1	1,90	2,6684E-17	FvH4_6g51150.1	1,57	0,043261
FvH4_5g11800.1	2,43	3,7432E-10	FvH4_1g26740.1	1,90	1,2028E-07	FvH4_3g25960.1	1,57	1,0623E-09
FvH4_5g36920.1	2,42	1,9794E-25	FvH4_6g01600.1	1,90	0,016397	FvH4_5g03960.1	1,57	0,0024112
FvH4_5g03920.1	2,42	0,001716	FvH4_6g18770.1	1,90	3,8601E-12	FvH4_6g39350.1	1,57	4,1609E-06
FvH4_6g38160.1	2,42	6,0817E-16	FvH4_6g34950.1	1,89	4,6825E-14	FvH4_5g21090.1	1,56	0,0024463
FvH4_7g08060.1	2,42	3,7596E-06	FvH4_2g15730.1	1,89	5,6646E-11	FvH4_5g12520.1	1,56	3,1038E-06

FvH4_4g35090.1	2,42	0,037853	FvH4_1g09180.1	1,89	0,024629	FvH4_6g26030.1	1,56	0,00017851
FvH4_2g21910.1	2,41	1,1458E-10	FvH4_7g29560.1	1,89	1,0131E-06	FvH4_3g13880.1	1,56	0,0067529
FvH4_4g29210.1	2,39	5,5756E-07	FvH4_1g02250.1	1,89	0,0006922	FvH4_4g19010.1	1,56	2,6207E-11
FvH4_3g12600.1	2,39	0,0019979	FvH4_6g23050.1	1,89	7,2748E-09	FvH4_4g03510.1	1,56	3,5871E-06
FvH4_1g05260.1	2,39	0,00003681	FvH4_2g26080.1	1,89	4,1469E-11	FvH4_1g00150.1	1,56	3,0292E-05
FvH4_6g43620.1	2,39	3,2549E-18	FvH4_3g17630.1	1,88	0,013449	FvH4_6g51060.1	1,55	0,00031804
FvH4_6g48460.1	2,38	0,0010327	FvH4_2g14220.1	1,87	0,00053832	FvH4_4g01690.1	1,55	1,4952E-06
FvH4_1g26890.1	2,38	4,0388E-05	FvH4_6g17120.1	1,87	4,6312E-05	FvH4_5g17710.1	1,55	1,1485E-05
FvH4_6g20160.1	2,37	0,0014646	FvH4_5g19840.1	1,87	4,2106E-15	FvH4_2g13410.1	1,54	7E-09
FvH4_2g34070.1	2,37	4,8636E-09	FvH4_6g46640.1	1,87	0,019023	FvH4_6g50590.1	1,54	0,0016334
FvH4_7g31330.1	2,37	1,2948E-07	FvH4_3g00570.1	1,87	4,6622E-14	FvH4_7g26430.1	1,54	9,2241E-09
FvH4_5g03520.1	2,36	0,0073852	FvH4_7g20800.1	1,86	3,8531E-05	FvH4_3g39410.1	1,54	8,4921E-10
FvH4_3g22440.1	2,36	1,8117E-15	FvH4_6g10190.1	1,86	3,9262E-14	FvH4_7g22970.1	1,54	6,2885E-06
FvH4_3g15430.1	2,36	0,021786	FvH4_2g29610.1	1,86	0,00075326	FvH4_3g01170.1	1,54	2,3942E-06
FvH4_3g44880.1	2,36	1,3811E-05	FvH4_5g08020.1	1,86	0,046558	FvH4_4g00070.1	1,54	5,8626E-07
FvH4_2g23220.1	2,35	9,3134E-08	FvH4_6g16550.1	1,85	0,014988	FvH4_7g00670.1	1,53	0,0010117
FvH4_3g07670.1	2,35	0,043486	FvH4_6g38900.1	1,85	3,2147E-08	FvH4_6g53230.1	1,53	2,7508E-06
FvH4_6g48340.1	2,35	0,00040947	FvH4_6g39670.1	1,85	1,4873E-11	FvH4_7g05940.1	1,53	0,012007
FvH4_7g16990.1	2,35	0,00008769	FvH4_5g39440.1	1,85	6,6662E-05	FvH4_4g34740.1	1,53	0,00070049
FvH4_7g05640.1	2,35	1,1643E-06	FvH4_6g40760.1	1,85	0,0029298	FvH4_1g03060.1	1,53	0,0054508
FvH4_1g30150.1	2,35	3,5639E-05	FvH4_3g30830.1	1,84	0,030731	FvH4_5g37840.1	1,52	0,00082536
FvH4_4g23710.1	2,34	0,00087309	FvH4_2g26630.1	1,84	1,7724E-06	FvH4_2g01060.1	1,52	2,7297E-08
FvH4_5g17690.1	2,34	5,4309E-21	FvH4_3g02630.1	1,84	0,0030007	FvH4_2g09920.1	1,52	5,5827E-09
FvH4_4g01760.1	2,34	0,007536	FvH4_3g37200.1	1,84	0,0077331	FvH4_5g14020.1	1,52	1,5722E-11
FvH4_4g31290.1	2,34	0,00047776	FvH4_7g21050.1	1,83	0,00013126	FvH4_3g25790.1	1,52	7,0571E-08
FvH4_5g10490.1	2,32	5,2717E-22	FvH4_6g03720.1	1,83	1,6777E-15	FvH4_6g26660.1	1,51	1,8405E-07
FvH4_6g49730.1	2,32	2,8983E-05	FvH4_3g00850.1	1,83	5,8029E-16	FvH4_2g32830.1	1,51	0,0058281
FvH4_4g03540.1	2,32	1,3804E-18	FvH4_6g46530.1	1,82	4,6825E-14	FvH4_4g35270.1	1,51	0,00062855
FvH4_7g32860.1	2,32	0,033859	FvH4_3g17910.1	1,82	0,0064227	FvH4_3g20230.1	1,51	4,4013E-05
FvH4_3g11240.1	2,32	4,2876E-08	FvH4_1g07560.1	1,82	6,2009E-07	FvH4_2g38480.1	1,51	1,33E-11
FvH4_2g16010.1	2,32	3,93E-13	FvH4_1g14170.1	1,82	5,7905E-15	FvH4_6g54460.1	1,50	3,8531E-05
FvH4_3g10300.1	2,31	2,8133E-16	FvH4_6g10120.1	1,81	0,00013126	FvH4_4g17880.1	1,50	2,8525E-08
FvH4_3g10210.1	2,31	7,6402E-05	FvH4_7g02540.1	1,80	1,9805E-06	FvH4_3g07680.1	1,50	3,9171E-09
FvH4_2g28080.1	2,31	0,00043151	FvH4_6g39330.1	1,80	0,000261	FvH4_5g32810.1	1,50	0,00014174
						FvH4_3g12720.1	1,50	4,0148E-05

Tabla Suplementaria 2.4: Lista de genes reprimidos en los frutos de la línea 11 FaNAC2 con  $\log_2$  de fold change de al menos -1,5. Se indica el identificador de del gen, el p-valor ajustado por el método de Benjamini and Hochberg y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj
FvH4_2g10810.1	-Inf	7,1786E-10	FvH4_2g08530.1	-2,48	0,00019698	FvH4_2g29860.1	-1,60	0,0076126
FvH4_3g14600.1	-Inf	0,0041896	FvH4_5g05280.1	-2,46	3,7605E-18	FvH4_6g52360.1	-1,59	0,00016787
FvH4_4g11550.1	-Inf	3,9173E-05	FvH4_7g14140.1	-2,46	0,0016241	FvH4_6g08000.1	-1,59	0,0010087
FvH4_6g05780.1	-Inf	0,0067086	FvH4_2g27560.1	-2,46	0,0036019	FvH4_5g25290.1	-1,59	0,00023361
FvH4_6g45560.1	-Inf	0,00044308	FvH4_2g29960.1	-2,41	0,047658	FvH4_6g09280.1	-1,59	1,5067E-07
FvH4_1g13960.1	-8,99	4,1083E-11	FvH4_3g36890.1	-2,41	4,5341E-06	FvH4_3g40310.1	-1,59	0,019253
FvH4_7g05920.1	-7,70	1,4809E-19	FvH4_5g24820.1	-2,40	0,00018722	FvH4_5g25420.1	-1,58	1,5649E-11
FvH4_7g31470.1	-6,99	0,0041962	FvH4_5g22620.1	-2,39	0,00014174	FvH4_2g06140.1	-1,58	6,4223E-05
FvH4_1g05000.1	-6,55	4,5534E-25	FvH4_4g31640.1	-2,34	7,5846E-12	FvH4_1g27460.1	-1,58	0,048664
FvH4_7g05900.1	-6,16	1,0778E-07	FvH4_3g39130.1	-2,34	1,6253E-06	FvH4_5g16700.1	-1,57	0,01775
FvH4_5g03220.1	-5,85	8,573E-83	FvH4_7g05880.1	-2,34	0,0005991	FvH4_3g27480.1	-1,57	9,2098E-06
FvH4_1g19930.1	-5,76	0,00059917	FvH4_2g16800.1	-2,34	0,0053224	FvH4_6g25940.1	-1,56	6,9254E-07
FvH4_5g20170.1	-5,62	0,0053156	FvH4_4g31040.1	-2,34	0,001272	FvH4_1g02720.1	-1,56	6,633E-09
FvH4_1g26380.1	-5,59	0,020227	FvH4_7g25200.1	-2,33	0,00057712	FvH4_5g35330.1	-1,56	0,014908
FvH4_3g13140.1	-5,47	1,5519E-10	FvH4_3g33180.1	-2,32	1,147E-06	FvH4_5g13660.1	-1,56	0,0090516
FvH4_4g32760.1	-5,20	0,0012188	FvH4_3g43600.1	-2,31	1,1354E-15	FvH4_5g26200.1	-1,56	0,00015199
FvH4_1g18220.1	-5,17	0,0013056	FvH4_2g40300.1	-2,31	0,040045	FvH4_2g18560.1	-1,55	9,8846E-07
FvH4_4g33490.1	-5,17	1,1554E-08	FvH4_7g03300.1	-2,31	0,038436	FvH4_1g15540.1	-1,54	0,030824
FvH4_4g04500.1	-5,15	0,0026797	FvH4_3g07090.1	-2,31	1,9998E-10	FvH4_3g23250.1	-1,54	0,007835
FvH4_5g24610.1	-5,12	4,1767E-09	FvH4_6g45080.1	-2,30	1,4255E-13	FvH4_3g24320.1	-1,54	1,9228E-11
FvH4_5g05960.1	-5,12	0,0059076	FvH4_7g12700.1	-2,30	0,032255	FvH4_3g01120.1	-1,54	0,001307
FvH4_6g43340.1	-4,91	0,00030476	FvH4_6g11230.1	-2,29	0,0023916	FvH4_5g32450.1	-1,53	1,6688E-11
FvH4_5g22090.1	-4,84	0,012384	FvH4_2g38970.1	-2,26	6,1815E-09	FvH4_7g01570.1	-1,53	3,6088E-05
FvH4_7g05910.1	-4,83	3,2069E-10	FvH4_6g11890.1	-2,25	2,8418E-06	FvH4_4g06610.1	-1,53	0,020041
FvH4_2g39460.1	-4,59	0,020723	FvH4_5g00760.1	-2,25	0,042182	FvH4_3g44490.1	-1,53	7,9458E-11
FvH4_7g05890.1	-4,58	2,4815E-15	FvH4_3g19400.1	-2,24	3,2687E-05	FvH4_7g23720.1	-1,52	0,0067708
FvH4_2g35290.1	-4,50	0,037156	FvH4_3g19740.1	-2,21	1,1185E-05	FvH4_1g02620.1	-1,52	6,4265E-11
FvH4_7g06420.1	-4,41	0,0028608	FvH4_7g10990.1	-2,21	7,2677E-09	FvH4_5g08430.1	-1,52	1,3317E-05
FvH4_6g45570.1	-4,35	0,0075409	FvH4_3g41930.1	-2,21	2,1937E-05	FvH4_3g07400.1	-1,52	0,0015584
FvH4_7g32920.1	-4,28	1,6029E-23	FvH4_1g03590.1	-2,14	0,00030774	FvH4_4g18560.1	-1,50	0,0059878
FvH4_1g13970.1	-4,10	3,9589E-10	FvH4_2g38320.1	-2,13	5,8642E-19	FvH4_4g04470.1	-1,50	0,049744
FvH4_2g05920.1	-4,08	9,1049E-06	FvH4_5g22610.1	-2,12	1,7949E-05	FvH4_2g04120.1	-1,50	6,7814E-10
FvH4_2g12320.1	-4,07	0,011586	FvH4_4g30650.1	-2,11	0,048341			
FvH4_4g32110.1	-4,07	0,037996	FvH4_6g05480.1	-2,09	0,0045738			
FvH4_6g25950.1	-4,05	0,010453	FvH4_2g09120.1	-2,09	1,1352E-07			
FvH4_6g25820.1	-4,03	0,02213	FvH4_5g28000.1	-2,08	0,013126			
FvH4_5g00370.1	-4,01	0,0017442	FvH4_5g10840.1	-2,08	0,0067529			
FvH4_4g25940.1	-4,01	0,014105	FvH4_2g23930.1	-2,08	9,19E-20			
FvH4_3g13990.1	-3,98	2,3442E-05	FvH4_4g37080.1	-2,08	5,2954E-07			
FvH4_1g12750.1	-3,95	0,020149	FvH4_2g07450.1	-2,06	0,0055305			
FvH4_3g01280.1	-3,93	4,0312E-08	FvH4_5g22830.1	-2,04	0,012081			
FvH4_c2g00050.1	-3,91	0,00040849	FvH4_5g34520.1	-2,04	0,00049842			
FvH4_6g10960.1	-3,89	0,00058021	FvH4_5g10890.1	-2,03	7,6267E-06			
FvH4_1g08470.1	-3,88	0,005475	FvH4_6g29340.1	-2,02	0,038883			
FvH4_4g11540.1	-3,79	0,0034189	FvH4_3g01020.1	-2,01	0,00111			
FvH4_4g21140.1	-3,77	0,029077	FvH4_6g07990.1	-2,01	6,5446E-13			
FvH4_2g34400.1	-3,77	5,0583E-07	FvH4_6g49960.1	-2,00	5,3044E-07			
FvH4_6g51170.1	-3,70	0,0052976	FvH4_2g04770.1	-1,99	0,0031835			
FvH4_4g03950.1	-3,67	0,013449	FvH4_3g27340.1	-1,99	2,2145E-05			
FvH4_6g19300.1	-3,65	4,7839E-46	FvH4_5g39020.1	-1,98	4,0032E-06			
FvH4_2g02840.1	-3,62	1,6244E-05	FvH4_2g16190.1	-1,98	0,010823			
FvH4_7g09150.1	-3,60	6,5074E-12	FvH4_3g27290.1	-1,98	0,021807			
FvH4_6g10910.1	-3,57	0,034464	FvH4_6g42900.1	-1,97	3,7935E-13			
FvH4_3g15010.1	-3,55	0,022248	FvH4_7g25660.1	-1,96	1,4696E-05			
FvH4_2g23620.1	-3,51	0,0052287	FvH4_1g04760.1	-1,93	0,011024			
FvH4_7g03900.1	-3,48	0,0031536	FvH4_5g04620.1	-1,93	4,067E-06			
FvH4_5g37600.1	-3,48	0,031063	FvH4_4g23130.1	-1,93	5,8257E-15			
FvH4_2g09110.1	-3,47	4,6825E-14	FvH4_1g28310.1	-1,93	0,041539			
FvH4_2g37880.1	-3,41	0,0017987	FvH4_4g05020.1	-1,90	6,4223E-05			

FvH4_7g05780.1	-3,41	6,0488E-23	FvH4_1g19390.1	-1,90	0,00042404			
FvH4_7g09160.1	-3,41	9,0194E-20	FvH4_3g23380.1	-1,90	8,7593E-05			
FvH4_5g28010.1	-3,40	4,0092E-05	FvH4_6g41730.1	-1,89	0,022018			
FvH4_2g07500.1	-3,40	0,00054361	FvH4_5g14760.1	-1,88	9,6709E-16			
FvH4_6g36450.1	-3,38	0,015911	FvH4_4g33060.1	-1,88	7,2362E-16			
FvH4_2g04790.1	-3,32	2,4372E-05	FvH4_4g03860.1	-1,87	1,3775E-06			
FvH4_2g08510.1	-3,30	4,0312E-08	FvH4_3g31880.1	-1,86	0,0017987			
FvH4_4g32340.1	-3,30	0,037301	FvH4_2g27680.1	-1,84	9,2098E-06			
FvH4_4g30710.1	-3,25	0,0053734	FvH4_6g19930.1	-1,84	0,021621			
FvH4_1g05400.1	-3,21	0,0080778	FvH4_6g47580.1	-1,84	0,027482			
FvH4_4g10810.1	-3,17	2,2747E-13	FvH4_4g03990.1	-1,82	0,0060632			
FvH4_4g10980.1	-3,15	0,00019862	FvH4_5g19080.1	-1,82	0,000648			
FvH4_6g09780.1	-3,08	6,1949E-06	FvH4_7g15020.1	-1,82	1,8109E-06			
FvH4_4g32710.1	-3,08	4,4863E-20	FvH4_2g27470.1	-1,82	1,2599E-16			
FvH4_4g04240.1	-3,05	0,0080047	FvH4_4g27750.1	-1,82	5,699E-06			
FvH4_1g15940.1	-3,04	2,3866E-05	FvH4_3g01130.1	-1,81	0,010979			
FvH4_3g41940.1	-3,04	8,5302E-09	FvH4_2g35090.1	-1,81	0,032651			
FvH4_1g18240.1	-3,04	0,040565	FvH4_4g27160.1	-1,81	5,3918E-16			
FvH4_6g05880.1	-3,03	0,039604	FvH4_2g10850.1	-1,80	0,048639			
FvH4_3g41990.1	-3,02	0,0029451	FvH4_5g39010.1	-1,80	7,2054E-07			
FvH4_7g18970.1	-3,00	1,3978E-06	FvH4_5g22060.1	-1,79	0,033811			
FvH4_4g26490.1	-2,99	0,036746	FvH4_1g07190.1	-1,79	1,1053E-12			
FvH4_4g32700.1	-2,99	9,882E-35	FvH4_4g00840.1	-1,78	0,012088			
FvH4_3g29670.1	-2,95	0,022968	FvH4_6g10700.1	-1,78	5,7328E-05			
FvH4_6g25830.1	-2,95	5,3495E-05	FvH4_6g35410.1	-1,78	7,6662E-07			
FvH4_6g37200.1	-2,94	2,2817E-05	FvH4_3g10920.1	-1,78	0,015721			
FvH4_6g30780.1	-2,94	0,0061909	FvH4_5g08420.1	-1,77	0,0036611			
FvH4_4g24010.1	-2,92	0,013629	FvH4_5g07560.1	-1,77	2,1141E-05			
FvH4_6g34050.1	-2,91	0,0072088	FvH4_5g28720.1	-1,76	0,0012279			
FvH4_4g11420.1	-2,91	9,2679E-09	FvH4_2g32990.1	-1,75	0,00096706			
FvH4_7g13880.1	-2,91	0,0011673	FvH4_6g49010.1	-1,74	0,028832			
FvH4_7g06410.1	-2,90	1,4832E-08	FvH4_6g45070.1	-1,74	8,3895E-05			
FvH4_1g30410.1	-2,90	6,3177E-07	FvH4_1g16230.1	-1,73	2,5512E-11			
FvH4_6g25780.1	-2,89	0,0072007	FvH4_4g30540.1	-1,73	0,0083646			
FvH4_7g09130.1	-2,83	0,0095187	FvH4_6g33360.1	-1,73	0,0038375			
FvH4_3g07010.1	-2,83	1,0361E-06	FvH4_5g36970.1	-1,72	0,00042404			
FvH4_5g28300.1	-2,83	0,049004	FvH4_5g08690.1	-1,72	0,00017311			
FvH4_2g19350.1	-2,81	0,0011196	FvH4_6g00660.1	-1,72	0,030257			
FvH4_4g01290.1	-2,80	0,0034602	FvH4_1g04870.1	-1,71	0,008282			
FvH4_3g17650.1	-2,80	4,1703E-12	FvH4_3g13530.1	-1,71	0,00001188			
FvH4_2g08520.1	-2,76	9,5217E-05	FvH4_3g07710.1	-1,71	5,4073E-07			
FvH4_6g07140.1	-2,74	2,7562E-11	FvH4_4g14420.1	-1,70	1,8328E-08			
FvH4_2g18020.1	-2,74	3,5927E-22	FvH4_3g17750.1	-1,69	1,4832E-08			
FvH4_6g05510.1	-2,72	0,01627	FvH4_2g26290.1	-1,68	0,012732			
FvH4_6g05870.1	-2,70	0,020748	FvH4_3g05370.1	-1,67	0,016494			
FvH4_6g40380.1	-2,69	0,042601	FvH4_6g38360.1	-1,67	0,011922			
FvH4_3g39550.1	-2,68	7,4853E-08	FvH4_4g23220.1	-1,67	2,3773E-05			
FvH4_7g27670.1	-2,62	0,0089895	FvH4_6g09010.1	-1,67	0,036132			
FvH4_4g24640.1	-2,60	0,036347	FvH4_5g04160.1	-1,66	0,0016365			
FvH4_2g09700.1	-2,55	1,9511E-11	FvH4_5g05880.1	-1,66	6,3111E-08			
FvH4_4g21780.1	-2,54	0,0061673	FvH4_6g14170.1	-1,66	7,9783E-13			
FvH4_4g19530.1	-2,53	0,001891	FvH4_5g32460.1	-1,65	1,5939E-05			
FvH4_1g02120.1	-2,53	1,9135E-27	FvH4_1g11810.1	-1,64	0,034834			
FvH4_1g05010.1	-2,50	0,0085092	FvH4_4g33950.1	-1,63	1,1917E-08			
FvH4_6g46340.1	-2,49	0,00033098	FvH4_4g27170.1	-1,62	6,2907E-05			
FvH4_6g13410.1	-2,49	0,001089	FvH4_1g16690.1	-1,61	1,1538E-06			
FvH4_1g04810.1	-2,48	5,3367E-05	FvH4_6g12230.1	-1,61	0,00065112			
FvH4_4g19540.1	-2,48	0,00088839	FvH4_2g18080.1	-1,61	0,0020393			
FvH4_4g15440.1	-2,48	1,0588E-07	FvH4_6g30430.1	-1,61	0,00022711			
FvH4_6g46740.1	-2,48	0,0078646	FvH4_3g45190.1	-1,60	0,010246			

Tabla Suplementaria 2.5: Lista de genes sobreexpresados en los frutos de la línea 3 FaNAC3 con  $\log_2$  de fold change de al menos 1,5. Se indica el identificador de del gen, el p-valor ajustado por el método de Benjamini and Hochberg y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj
FvH4_7g28760.1	8,08	1,1722E-25	FvH4_7g16070.1	2,71	0,0023863	FvH4_7g20610.1	1,86	0,036499
FvH4_1g10790.1	6,98	2,713E-132	FvH4_7g29740.1	2,70	3,9256E-06	FvH4_2g30840.1	1,86	1,5105E-07
FvH4_1g13480.1	6,89	5,5649E-57	FvH4_5g19570.1	2,70	5,2638E-18	FvH4_3g39430.1	1,86	0,00026413
FvH4_4g15300.1	6,78	6,9784E-89	FvH4_2g25280.1	2,68	5,6253E-38	FvH4_7g09060.1	1,84	8,3688E-07
FvH4_3g29920.1	6,78	1,1691E-20	FvH4_5g35540.1	2,68	5,0203E-19	FvH4_3g38930.1	1,84	5,3384E-05
FvH4_6g17940.1	6,77	1,8614E-10	FvH4_4g30020.1	2,68	0,019865	FvH4_7g21180.1	1,83	0,0011242
FvH4_7g12310.1	6,46	4,3015E-50	FvH4_7g13190.1	2,66	0,015956	FvH4_7g18460.1	1,83	2,2628E-06
FvH4_7g17170.1	6,40	1,1189E-15	FvH4_7g23440.1	2,66	0,0019395	FvH4_2g29680.1	1,82	2,9025E-20
FvH4_6g53210.1	6,27	0,00011982	FvH4_1g15940.1	2,66	1,0485E-26	FvH4_6g23550.1	1,82	3,5439E-20
FvH4_7g02330.1	6,19	3,8861E-13	FvH4_2g39130.1	2,66	1,1434E-26	FvH4_4g29030.1	1,82	0,0055709
FvH4_4g17210.1	6,07	6,681E-109	FvH4_5g24450.1	2,65	0,023603	FvH4_1g30140.1	1,82	0,013587
FvH4_6g36630.1	5,98	9,3229E-06	FvH4_2g14670.1	2,65	0,0031211	FvH4_6g47810.1	1,81	3,078E-06
FvH4_2g06010.1	5,97	1,4802E-27	FvH4_3g06570.1	2,64	1,259E-12	FvH4_7g21090.1	1,81	0,0036474
FvH4_4g33690.1	5,94	4,5573E-30	FvH4_2g36650.1	2,63	2,1987E-06	FvH4_7g19590.1	1,81	0,00000154
FvH4_5g29210.1	5,84	2,5896E-21	FvH4_6g09860.1	2,63	0,00027555	FvH4_3g44800.1	1,81	0,028784
FvH4_7g29300.1	5,82	4,7661E-10	FvH4_3g42760.1	2,62	1,3954E-09	FvH4_2g00920.1	1,81	0,0046736
FvH4_3g02700.1	5,53	1,4434E-12	FvH4_6g30250.1	2,62	0,045344	FvH4_7g19330.1	1,81	1,1544E-14
FvH4_5g21560.1	5,48	0,00074361	FvH4_1g22380.1	2,61	0,031651	FvH4_6g20510.1	1,80	3,7898E-06
FvH4_3g06220.1	5,40	0,0012342	FvH4_3g23410.1	2,61	4,0704E-39	FvH4_3g17630.1	1,80	0,0096486
FvH4_2g38050.1	5,39	1,5213E-33	FvH4_1g10910.1	2,60	6,9912E-23	FvH4_3g01910.1	1,80	5,6244E-19
FvH4_6g16400.1	5,24	1,3612E-06	FvH4_6g46490.1	2,59	0,00013462	FvH4_6g53850.1	1,79	1,8081E-15
FvH4_5g19560.1	5,21	0,00075769	FvH4_7g09650.1	2,59	0,018619	FvH4_4g04480.1	1,79	0,026378
FvH4_7g28450.1	5,14	0,0012236	FvH4_2g20620.1	2,57	5,5336E-06	FvH4_7g12120.1	1,78	1,1758E-14
FvH4_4g35540.1	5,09	8,0139E-11	FvH4_7g30360.1	2,57	0,00010782	FvH4_6g12230.1	1,78	2,6945E-10
FvH4_2g09060.1	5,06	0,0066918	FvH4_5g21090.1	2,56	8,408E-09	FvH4_4g24080.1	1,78	0,00043894
FvH4_6g23130.1	5,03	0,0080654	FvH4_6g10320.1	2,56	0,045966	FvH4_5g27040.1	1,78	0,014967
FvH4_1g20160.1	5,03	2,1316E-09	FvH4_7g25500.1	2,56	3,8945E-31	FvH4_2g15670.1	1,78	3,1682E-07
FvH4_2g35930.1	4,93	0,004238	FvH4_1g12730.1	2,54	6,8846E-14	FvH4_7g18870.1	1,77	1,2624E-16
FvH4_3g00510.1	4,91	1,4844E-37	FvH4_7g02790.1	2,54	2,5433E-08	FvH4_6g10130.1	1,76	8,4511E-10
FvH4_2g24060.1	4,86	1,4434E-12	FvH4_6g50530.1	2,53	2,6893E-20	FvH4_3g21380.1	1,76	0,0042807
FvH4_3g01620.1	4,84	5,6291E-70	FvH4_7g33040.1	2,53	1,2232E-11	FvH4_3g41850.1	1,76	1,1077E-18
FvH4_3g42800.1	4,73	0,00032447	FvH4_3g15010.1	2,53	0,0001585	FvH4_5g08380.1	1,75	6,8967E-05
FvH4_3g06030.1	4,68	0,00057989	FvH4_5g22210.1	2,52	8,0759E-14	FvH4_4g18930.1	1,74	7,3477E-14
FvH4_2g39610.1	4,61	7,0706E-47	FvH4_4g36810.1	2,52	0,02459	FvH4_7g02910.1	1,74	0,0095302
FvH4_1g09170.1	4,58	1,2163E-05	FvH4_2g16050.1	2,51	1,2176E-10	FvH4_3g10940.1	1,74	0,0085557
FvH4_3g12860.1	4,55	1,0082E-14	FvH4_6g34110.1	2,50	0,00091006	FvH4_5g00730.1	1,74	0,03573
FvH4_5g37610.1	4,55	1,1747E-33	FvH4_3g10300.1	2,49	1,2841E-35	FvH4_4g10610.1	1,73	7,8899E-05
FvH4_6g18320.1	4,54	0,02476	FvH4_4g20730.1	2,48	2,5307E-11	FvH4_3g36850.1	1,73	1,7929E-08
FvH4_3g45520.1	4,52	1,1147E-62	FvH4_6g43800.1	2,47	1,0239E-07	FvH4_2g36350.1	1,72	0,040097
FvH4_7g22310.1	4,49	0,0004767	FvH4_6g41800.1	2,46	0,0013654	FvH4_1g22110.1	1,72	0,028315
FvH4_1g19240.1	4,47	1,7337E-22	FvH4_4g17720.1	2,46	7,9765E-06	FvH4_4g33350.1	1,71	0,0032569
FvH4_2g25010.1	4,46	1,8857E-06	FvH4_7g14860.1	2,46	0,0018313	FvH4_5g02700.1	1,71	3,4558E-07
FvH4_3g15030.1	4,46	1,1544E-35	FvH4_4g33220.1	2,45	2,5846E-06	FvH4_6g05880.1	1,71	6,3737E-08
FvH4_2g03820.1	4,42	5,1683E-81	FvH4_6g08640.1	2,45	4,1735E-22	FvH4_3g17330.1	1,71	8,6206E-17
FvH4_5g00180.1	4,40	0,0015028	FvH4_1g11710.1	2,44	1,8145E-20	FvH4_4g31210.1	1,71	7,5365E-14
FvH4_2g35270.1	4,40	1,3564E-17	FvH4_5g37150.1	2,43	1,643E-12	FvH4_1g04030.1	1,71	0,028654
FvH4_2g37850.1	4,36	0,045828	FvH4_7g14050.1	2,42	0,032866	FvH4_2g20300.1	1,70	1,5691E-15
FvH4_3g23460.1	4,32	2,2807E-15	FvH4_6g09960.1	2,42	1,092E-11	FvH4_4g28640.1	1,70	2,378E-11
FvH4_5g28480.1	4,31	1,8721E-09	FvH4_3g05310.1	2,41	0,04262	FvH4_4g14180.1	1,70	0,00021941
FvH4_4g00800.1	4,29	1,7362E-38	FvH4_7g32600.1	2,40	1,2925E-16	FvH4_7g32520.1	1,69	4,8549E-17
FvH4_4g36270.1	4,29	2,7E-08	FvH4_4g06540.1	2,40	0,022624	FvH4_1g04760.1	1,69	1,5906E-05
FvH4_3g17800.1	4,28	1,9931E-14	FvH4_7g23050.1	2,39	0,035174	FvH4_6g10780.1	1,69	9,2352E-05
FvH4_6g00540.1	4,27	7,0157E-05	FvH4_1g18170.1	2,39	3,2784E-30	FvH4_5g36240.1	1,68	3,9491E-12
FvH4_2g18930.1	4,26	0,0036545	FvH4_6g44730.1	2,38	5,5841E-05	FvH4_6g45860.1	1,68	5,0449E-08
FvH4_6g08340.1	4,26	1,683E-18	FvH4_7g21560.1	2,38	1,256E-11	FvH4_6g41980.1	1,68	0,012729
FvH4_2g08040.1	4,23	5,2506E-10	FvH4_5g16550.1	2,36	7,1243E-07	FvH4_4g29730.1	1,68	2,1152E-16
FvH4_3g40160.1	4,20	4,0924E-05	FvH4_4g16720.1	2,36	9,3051E-06	FvH4_1g30150.1	1,67	1,1211E-06
FvH4_6g11960.1	4,19	0,00027555	FvH4_6g40340.1	2,35	7,9013E-07	FvH4_3g01890.1	1,67	2,6244E-06
FvH4_4g33700.1	4,19	4,2481E-05	FvH4_6g19170.1	2,34	6,0485E-05	FvH4_2g33010.1	1,67	0,0016308

FvH4_3g42410.1	4,08	0,00017581	FvH4_6g03790.1	2,34	3,5735E-16	FvH4_4g02010.1	1,67	1,3162E-08
FvH4_6g21360.1	4,03	3,5261E-39	FvH4_4g30270.1	2,33	0,010465	FvH4_1g00360.1	1,66	9,8679E-15
FvH4_3g09010.1	4,01	8,8247E-56	FvH4_1g15860.1	2,33	1,5245E-10	FvH4_4g04470.1	1,65	4,2088E-05
FvH4_4g13520.1	3,97	1,9487E-68	FvH4_7g04740.1	2,33	0,00017581	FvH4_7g25830.1	1,65	1,0516E-12
FvH4_2g20250.1	3,94	0,029245	FvH4_2g28080.1	2,33	0,0002754	FvH4_1g18910.1	1,65	0,0074287
FvH4_7g06230.1	3,91	0,0020771	FvH4_3g06200.1	2,33	1,1685E-19	FvH4_4g23860.1	1,65	0,017162
FvH4_1g02610.1	3,91	2,9305E-06	FvH4_1g01530.1	2,33	7,761E-09	FvH4_6g39710.1	1,65	0,00013612
FvH4_3g05430.1	3,91	0,029412	FvH4_5g16480.1	2,32	6,4936E-11	FvH4_2g30280.1	1,65	5,344E-06
FvH4_4g29240.1	3,91	4,929E-14	FvH4_3g40860.1	2,32	1,0709E-25	FvH4_2g28300.1	1,64	4,1973E-15
FvH4_3g37210.1	3,86	9E-09	FvH4_5g37620.1	2,32	0,0043019	FvH4_5g02340.1	1,64	1,3908E-10
FvH4_4g27840.1	3,85	0,00058173	FvH4_5g28490.1	2,30	1,1054E-09	FvH4_7g01570.1	1,64	2,0115E-12
FvH4_3g01520.1	3,84	5,5841E-05	FvH4_4g32960.1	2,30	1,9183E-05	FvH4_3g31070.1	1,64	1,3532E-06
FvH4_1g14900.1	3,83	1,1422E-35	FvH4_2g00340.1	2,28	7,8958E-27	FvH4_7g15190.1	1,64	3,4206E-08
FvH4_5g05970.1	3,83	0,00053243	FvH4_2g16190.1	2,28	2,1233E-26	FvH4_7g13170.1	1,64	8,8424E-12
FvH4_7g06110.1	3,81	1,7933E-34	FvH4_2g29700.1	2,28	0,027804	FvH4_2g03930.1	1,64	2,1837E-05
FvH4_5g07260.1	3,81	1,4434E-12	FvH4_7g22670.1	2,28	9,6138E-06	FvH4_5g10450.1	1,63	0,00012533
FvH4_6g47290.1	3,77	9,3998E-11	FvH4_6g43350.1	2,28	5,8095E-12	FvH4_3g38970.1	1,63	1,0613E-06
FvH4_3g11640.1	3,77	0,0098364	FvH4_7g27920.1	2,27	3,3432E-08	FvH4_6g52580.1	1,63	0,000331
FvH4_3g11090.1	3,76	9,16E-72	FvH4_6g02970.1	2,27	0,013791	FvH4_7g11260.1	1,62	0,0096486
FvH4_1g13420.1	3,74	1,3394E-36	FvH4_3g01260.1	2,26	1,248E-12	FvH4_4g22220.1	1,62	0,0080364
FvH4_3g42580.1	3,74	0,024142	FvH4_7g14070.1	2,25	0,0062134	FvH4_4g21720.1	1,62	1,318E-07
FvH4_7g15740.1	3,71	9,4843E-37	FvH4_3g41210.1	2,25	0,013925	FvH4_4g27020.1	1,62	0,011526
FvH4_7g02240.1	3,71	7,8942E-13	FvH4_6g16950.1	2,25	8,3445E-07	FvH4_7g20640.1	1,61	5,5288E-05
FvH4_6g11970.1	3,71	1,9146E-09	FvH4_1g24320.1	2,24	2,05E-21	FvH4_7g08180.1	1,61	0,00037032
FvH4_3g37230.1	3,70	2,0036E-37	FvH4_1g06980.1	2,24	0,00074361	FvH4_6g17500.1	1,61	0,046897
FvH4_3g11750.1	3,69	1,2346E-09	FvH4_5g16090.1	2,23	0,036438	FvH4_2g22930.1	1,61	0,026164
FvH4_2g21650.1	3,69	4,5573E-30	FvH4_7g08420.1	2,22	6,5274E-15	FvH4_7g23670.1	1,61	1,2438E-08
FvH4_2g18850.1	3,66	7,6188E-05	FvH4_2g28820.1	2,21	4,1855E-12	FvH4_6g27910.1	1,61	8,5698E-05
FvH4_2g24300.1	3,63	1,2531E-19	FvH4_6g41730.1	2,20	1,98E-07	FvH4_7g29610.1	1,61	0,0014933
FvH4_4g06860.1	3,62	2,1807E-05	FvH4_5g37700.1	2,19	2,4268E-15	FvH4_2g40480.1	1,60	0,0033915
FvH4_2g40610.1	3,61	6,1073E-32	FvH4_5g11450.1	2,19	0,010791	FvH4_1g05090.1	1,60	0,048675
FvH4_4g26490.1	3,59	9,0202E-31	FvH4_7g32880.1	2,18	7,3477E-14	FvH4_7g02730.1	1,60	1,5206E-08
FvH4_3g29080.1	3,59	5,8526E-35	FvH4_7g02150.1	2,18	1,4571E-25	FvH4_7g04760.1	1,59	7,3477E-14
FvH4_7g03920.1	3,57	0,025672	FvH4_5g17650.1	2,17	8,7666E-25	FvH4_2g27000.1	1,59	5,1597E-13
FvH4_5g10640.1	3,55	0,02544	FvH4_2g34690.1	2,17	0,00050126	FvH4_6g48120.1	1,59	5,1539E-14
FvH4_4g23710.1	3,53	4,9152E-13	FvH4_7g01250.1	2,17	3,1177E-06	FvH4_2g07220.1	1,58	1,8099E-06
FvH4_2g40600.1	3,52	4,4692E-30	FvH4_4g14210.1	2,17	1,0832E-10	FvH4_3g40840.1	1,58	2,5234E-07
FvH4_5g21830.1	3,51	1,732E-06	FvH4_5g13490.1	2,17	1,7403E-22	FvH4_1g29860.1	1,58	0,03898
FvH4_4g24660.1	3,51	2,5412E-22	FvH4_7g01450.1	2,17	7,4574E-11	FvH4_5g35940.1	1,57	5,0979E-15
FvH4_4g22570.1	3,45	0,00082444	FvH4_4g33080.1	2,15	1,9504E-08	FvH4_3g01280.1	1,57	7,9311E-10
FvH4_6g36500.1	3,41	5,8765E-53	FvH4_5g31280.1	2,15	0,00009305	FvH4_2g17430.1	1,57	0,00063015
FvH4_7g24430.1	3,41	4,2706E-60	FvH4_6g36460.1	2,15	1,0832E-23	FvH4_4g26310.1	1,57	0,041029
FvH4_3g25370.1	3,40	2,2831E-22	FvH4_5g38240.1	2,15	0,0010969	FvH4_3g14730.1	1,56	0,0047284
FvH4_7g13480.1	3,40	8,2056E-57	FvH4_3g25510.1	2,14	2,6502E-09	FvH4_3g12620.1	1,56	0,048258
FvH4_4g04600.1	3,40	0,0073315	FvH4_2g09110.1	2,13	4,7856E-27	FvH4_6g23620.1	1,56	6,3134E-10
FvH4_7g30000.1	3,39	0,044171	FvH4_1g11690.1	2,13	1,2469E-22	FvH4_3g12280.1	1,56	0,031269
FvH4_4g20990.1	3,37	4,1737E-05	FvH4_6g48340.1	2,13	0,0027748	FvH4_4g32110.1	1,56	0,00013966
FvH4_6g13680.1	3,36	4,1536E-28	FvH4_1g02500.1	2,13	6,0564E-23	FvH4_7g23760.1	1,55	0,00018479
FvH4_2g12380.1	3,34	4,6886E-19	FvH4_2g20470.1	2,13	2,1343E-09	FvH4_3g11140.1	1,55	0,034729
FvH4_6g11510.1	3,33	2,0475E-32	FvH4_5g02880.1	2,12	3,0765E-24	FvH4_2g04280.1	1,55	0,019063
FvH4_4g18290.1	3,33	2,0679E-09	FvH4_4g14390.1	2,11	0,00016752	FvH4_6g36490.1	1,55	0,033161
FvH4_6g38520.1	3,33	6,4576E-17	FvH4_3g11120.1	2,11	5,4726E-22	FvH4_6g00690.1	1,55	5,0608E-10
FvH4_5g06370.1	3,32	0,0018611	FvH4_7g17850.1	2,11	7,2864E-20	FvH4_3g34910.1	1,55	0,0032569
FvH4_1g11720.1	3,32	4,4177E-48	FvH4_5g17710.1	2,10	6,1644E-15	FvH4_3g38990.1	1,55	4,6053E-13
FvH4_5g10830.1	3,31	2,6467E-46	FvH4_6g53110.1	2,08	0,00062288	FvH4_3g01370.1	1,54	1,5556E-05
FvH4_7g32560.1	3,28	2,1164E-08	FvH4_2g16740.1	2,07	2,4244E-18	FvH4_1g27530.1	1,54	0,0007749
FvH4_6g20610.1	3,27	1,5842E-26	FvH4_4g35980.1	2,07	9,3229E-06	FvH4_7g06530.1	1,54	1,238E-10
FvH4_6g53000.1	3,27	0,0043069	FvH4_6g24620.1	2,07	0,029554	FvH4_5g34770.1	1,54	0,02305
FvH4_6g50930.1	3,26	7,9724E-48	FvH4_4g27890.1	2,07	0,013779	FvH4_3g26340.1	1,54	0,0029203
FvH4_3g35980.1	3,24	0,00035104	FvH4_2g21690.1	2,06	0,00040801	FvH4_2g16650.1	1,53	4,2313E-12

FvH4_6g42800.1	3,23	7,1782E-52	FvH4_1g14090.1	2,05	4,1996E-22	FvH4_6g29380.1	1,53	4,8807E-05
FvH4_4g36980.1	3,23	1,539E-53	FvH4_5g07570.1	2,05	0,0011431	FvH4_1g14860.1	1,52	1,1968E-05
FvH4_1g29340.1	3,22	0,0077219	FvH4_4g36100.1	2,04	6,6929E-07	FvH4_7g00280.1	1,51	1,8636E-11
FvH4_2g21630.1	3,20	9,9219E-33	FvH4_2g33110.1	2,03	0,00025531	FvH4_2g29120.1	1,51	7,7562E-07
FvH4_4g34350.1	3,20	3,8299E-17	FvH4_2g32440.1	2,03	2,7786E-06	FvH4_6g14170.1	1,50	8,6183E-14
FvH4_3g23150.1	3,19	5,8526E-35	FvH4_1g16090.1	2,03	0,0034813			
FvH4_7g13840.1	3,18	3,1108E-07	FvH4_6g49730.1	2,03	0,00082444			
FvH4_4g20880.1	3,17	4,904E-19	FvH4_5g08570.1	2,03	1,0173E-05			
FvH4_7g24370.1	3,16	3,7207E-14	FvH4_1g18300.1	2,02	1,5277E-18			
FvH4_4g01290.1	3,16	5,4445E-22	FvH4_2g39150.1	2,01	0,042129			
FvH4_6g03120.1	3,15	6,368E-44	FvH4_4g34890.1	2,01	0,00091553			
FvH4_6g35250.1	3,14	0,0093403	FvH4_3g38920.1	2,01	1,8707E-14			
FvH4_7g07900.1	3,14	3,6748E-49	FvH4_2g39750.1	2,00	0,015816			
FvH4_2g36180.1	3,14	0,00089612	FvH4_4g19230.1	2,00	1,1129E-21			
FvH4_3g37770.1	3,13	6,0738E-07	FvH4_6g16630.1	2,00	0,00015651			
FvH4_7g11220.1	3,13	0,00000023	FvH4_1g15220.1	2,00	2,7979E-23			
FvH4_6g41930.1	3,12	0,0063185	FvH4_1g18550.1	1,99	2,6951E-14			
FvH4_7g02230.1	3,11	4,4152E-31	FvH4_3g26010.1	1,98	7,0005E-05			
FvH4_1g08930.1	3,11	0,0071597	FvH4_3g44180.1	1,98	0,046855			
FvH4_6g46560.1	3,11	0,036544	FvH4_3g36030.1	1,98	1E-09			
FvH4_1g20590.1	3,10	1,4412E-16	FvH4_6g22890.1	1,98	0,0031915			
FvH4_4g16900.1	3,09	6,6739E-43	FvH4_7g01760.1	1,98	2,5234E-07			
FvH4_7g06100.1	3,06	1,8611E-16	FvH4_1g25540.1	1,97	1,6697E-11			
FvH4_7g24420.1	3,06	7,4035E-39	FvH4_2g22760.1	1,97	0,0010124			
FvH4_3g33240.1	3,05	0,005364	FvH4_4g23480.1	1,96	1,5445E-21			
FvH4_1g26280.1	3,05	8,5661E-45	FvH4_5g24190.1	1,96	6,6769E-08			
FvH4_7g08770.1	3,04	0,012922	FvH4_5g00320.1	1,95	2,1594E-20			
FvH4_6g13070.1	3,02	2,2227E-18	FvH4_3g37240.1	1,94	5,1631E-11			
FvH4_7g17300.1	3,02	0,0026085	FvH4_2g38380.1	1,94	0,01373			
FvH4_4g35910.1	3,02	1,9499E-42	FvH4_5g39430.1	1,94	0,0083184			
FvH4_6g20340.1	3,00	0,012655	FvH4_7g12950.1	1,94	0,00000021			
FvH4_5g26560.1	3,00	0,004994	FvH4_1g12110.1	1,93	1,7267E-15			
FvH4_7g21760.1	2,97	0,03653	FvH4_3g44500.1	1,93	8,2177E-22			
FvH4_6g30300.1	2,96	0,0065824	FvH4_4g34160.1	1,93	0,014775			
FvH4_1g18680.1	2,95	0,0044979	FvH4_6g33260.1	1,92	1,0872E-21			
FvH4_6g33140.1	2,93	0,00021153	FvH4_7g24230.1	1,92	2,7271E-22			
FvH4_6g45140.1	2,93	4,5851E-27	FvH4_7g25840.1	1,91	0,0045069			
FvH4_1g24830.1	2,92	2,7764E-06	FvH4_3g02950.1	1,91	0,04523			
FvH4_2g32040.1	2,91	6,4503E-42	FvH4_7g19650.1	1,91	2,5234E-07			
FvH4_7g23420.1	2,90	2,4139E-48	FvH4_3g15430.1	1,91	0,01389			
FvH4_3g39040.1	2,90	0,0037215	FvH4_3g11240.1	1,90	3,1913E-05			
FvH4_2g14830.1	2,89	0,010342	FvH4_5g20730.1	1,90	1,9444E-06			
FvH4_3g00680.1	2,89	0,021289	FvH4_7g06750.1	1,90	2,9715E-08			
FvH4_6g08580.1	2,88	0,043098	FvH4_7g25590.1	1,89	7,868E-17			
FvH4_5g05460.1	2,88	3,8869E-17	FvH4_1g16930.1	1,89	1,2068E-08			
FvH4_6g39380.1	2,86	1,1223E-22	FvH4_3g34860.1	1,89	2,0102E-12			
FvH4_7g17880.1	2,85	6,6724E-20	FvH4_7g28510.1	1,89	3,2512E-16			
FvH4_7g13570.1	2,85	0,041722	FvH4_2g30990.1	1,89	3,4558E-07			
FvH4_7g08450.1	2,84	3,5101E-05	FvH4_6g37770.1	1,89	0,020525			
FvH4_7g20080.1	2,84	7,929E-11	FvH4_7g33120.1	1,88	2,1593E-22			
FvH4_4g30210.1	2,82	2,862E-06	FvH4_2g35090.1	1,88	1,0592E-08			
FvH4_1g14930.1	2,81	2,4209E-08	FvH4_6g41290.1	1,87	0,01461			
FvH4_2g14690.1	2,79	0,0050859	FvH4_6g39430.1	1,87	1,5197E-05			
FvH4_1g24790.1	2,79	0,0014286	FvH4_1g16970.1	1,87	2,8203E-10			
FvH4_4g04030.1	2,78	1,1396E-42	FvH4_3g10920.1	1,87	1,5457E-08			
FvH4_4g24670.1	2,78	3,9664E-23	FvH4_1g21450.1	1,87	1,5541E-20			
FvH4_4g37300.1	2,77	2,7381E-14	FvH4_2g15780.1	1,86	0,00021891			
FvH4_2g12590.1	2,76	1,6619E-37	FvH4_5g23180.1	1,86	9,8413E-13			
FvH4_5g23980.1	2,75	1,2952E-18	FvH4_7g04820.1	1,86	6,1129E-07			
FvH4_7g32570.1	2,75	1,0647E-41	FvH4_2g28010.1	1,86	0,0016651			

Tabla Suplementaria 2.6: Lista de genes reprimidos en los frutos de la línea 3 FaNAC3 con  $\log_2$  de fold change de al menos -1,5. Se indica el identificador de del gen, el p-valor ajustado por el método de Benjamini and Hochberg y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj	Gene_id	log2FoldCha	padj
FvH4_1g19800.1	-Inf	0,021015	FvH4_3g12720.1	-2,43	9,8954E-06	FvH4_1g18090.1	-1,70	3,457E-06
FvH4_2g41070.1	-Inf	0,013694	FvH4_1g12210.1	-2,43	0,02966	FvH4_7g05890.1	-1,69	8,3798E-05
FvH4_6g42630.1	-Inf	0,0075979	FvH4_4g19530.1	-2,43	0,0019467	FvH4_6g09120.1	-1,68	0,0017252
FvH4_7g05920.1	-5,06	9,8975E-17	FvH4_4g24770.1	-2,43	0,00034599	FvH4_4g25770.1	-1,68	0,00043388
FvH4_5g24610.1	-4,96	9,5239E-09	FvH4_1g15840.1	-2,42	0,00056606	FvH4_3g14050.1	-1,67	2,0964E-06
FvH4_3g08830.1	-4,82	0,031651	FvH4_3g36020.1	-2,42	0,028282	FvH4_3g12180.1	-1,66	0,013393
FvH4_5g39300.1	-4,76	0,021834	FvH4_3g39620.1	-2,40	1,3243E-06	FvH4_4g28410.1	-1,66	5,9387E-05
FvH4_2g03460.1	-4,75	8,9797E-05	FvH4_4g17150.1	-2,40	3,919E-08	FvH4_2g06140.1	-1,65	9,8331E-06
FvH4_3g35100.1	-4,73	0,047351	FvH4_1g28430.1	-2,40	5,0324E-06	FvH4_3g24690.1	-1,65	0,047351
FvH4_7g24060.1	-4,53	5,8847E-05	FvH4_3g36410.1	-2,39	0,0031038	FvH4_4g26600.1	-1,65	0,045966
FvH4_7g17120.1	-4,51	0,036694	FvH4_5g35590.1	-2,36	0,044323	FvH4_4g37080.1	-1,65	1,7767E-05
FvH4_5g01840.1	-4,50	0,026109	FvH4_1g17140.1	-2,35	0,0018485	FvH4_2g02590.1	-1,65	3,9E-08
FvH4_7g21270.1	-4,46	0,04494	FvH4_6g39460.1	-2,35	0,012064	FvH4_3g44920.1	-1,64	0,00091553
FvH4_4g03500.1	-4,41	4,3359E-05	FvH4_2g35280.1	-2,35	1,9125E-05	FvH4_6g39660.1	-1,64	7,633E-10
FvH4_7g05910.1	-4,38	1,2346E-09	FvH4_3g35790.1	-2,34	1,5525E-09	FvH4_3g00850.1	-1,63	0,01646
FvH4_2g41060.1	-4,30	1,5554E-09	FvH4_1g15330.1	-2,34	1,7788E-05	FvH4_3g27340.1	-1,63	5,9065E-05
FvH4_4g18870.1	-4,23	0,034297	FvH4_6g49960.1	-2,33	1,1888E-09	FvH4_2g07800.1	-1,63	0,010036
FvH4_2g05370.1	-4,21	0,028477	FvH4_6g10250.1	-2,33	2,5E-08	FvH4_5g19980.1	-1,63	0,029741
FvH4_1g19790.1	-4,12	0,01468	FvH4_2g03340.1	-2,32	0,001281	FvH4_1g09070.1	-1,62	0,003179
FvH4_1g08500.1	-4,05	0,00087874	FvH4_6g40530.1	-2,31	0,022791	FvH4_4g24790.1	-1,62	0,013256
FvH4_2g32720.1	-3,99	0,012674	FvH4_2g20030.1	-2,31	0,043814	FvH4_2g34400.1	-1,61	0,011196
FvH4_5g03420.1	-3,99	1,2659E-11	FvH4_2g18440.1	-2,27	0,010315	FvH4_3g20710.1	-1,60	0,022989
FvH4_6g45370.1	-3,96	0,044583	FvH4_7g25560.1	-2,26	4,9279E-05	FvH4_2g24930.1	-1,60	8,3798E-05
FvH4_7g05900.1	-3,96	9,3229E-06	FvH4_2g05020.1	-2,26	7,5434E-13	FvH4_4g02850.1	-1,59	0,041169
FvH4_2g35260.1	-3,93	1,6086E-05	FvH4_6g39670.1	-2,26	2,4013E-09	FvH4_6g40280.1	-1,59	0,010161
FvH4_5g11530.1	-3,92	0,020431	FvH4_2g35370.1	-2,23	0,041878	FvH4_1g21200.1	-1,58	1,3064E-08
FvH4_6g25820.1	-3,80	0,026365	FvH4_1g29310.1	-2,22	2,9354E-05	FvH4_6g29890.1	-1,58	0,039825
FvH4_5g08020.1	-3,79	0,0069277	FvH4_1g27440.1	-2,22	0,0098288	FvH4_2g02340.1	-1,58	8,5673E-05
FvH4_6g19270.1	-3,79	0,049961	FvH4_5g03320.1	-2,21	0,0043495	FvH4_6g14370.1	-1,58	0,0012991
FvH4_1g02250.1	-3,76	0,0040992	FvH4_4g23130.1	-2,20	1,4864E-18	FvH4_7g08920.1	-1,58	0,0085557
FvH4_1g12590.1	-3,76	0,0015289	FvH4_2g14570.1	-2,16	0,0076708	FvH4_7g05780.1	-1,57	1,0246E-07
FvH4_1g01470.1	-3,75	0,037438	FvH4_1g16690.1	-2,16	1,5406E-09	FvH4_7g05880.1	-1,57	0,00040801
FvH4_6g08100.1	-3,73	0,0015144	FvH4_5g05930.1	-2,15	0,036159	FvH4_4g11750.1	-1,57	0,011307
FvH4_4g07760.1	-3,67	0,040019	FvH4_5g09000.1	-2,14	0,0027324	FvH4_6g43620.1	-1,57	8,6907E-05
FvH4_2g08400.1	-3,66	0,00052981	FvH4_4g36110.1	-2,13	1,5209E-06	FvH4_6g34500.1	-1,56	0,0001667
FvH4_1g15780.1	-3,62	0,015908	FvH4_6g21020.1	-2,12	0,025828	FvH4_3g11580.1	-1,56	0,020161
FvH4_2g37650.1	-3,59	0,00158	FvH4_7g00670.1	-2,12	0,0093896	FvH4_1g18100.1	-1,56	8,5633E-05
FvH4_1g14470.1	-3,56	0,021887	FvH4_4g22330.1	-2,11	1,6323E-13	FvH4_1g02880.1	-1,55	2,5044E-05
FvH4_6g31230.1	-3,51	0,0099575	FvH4_4g28380.1	-2,10	0,0015715	FvH4_3g03430.1	-1,55	6,7E-08
FvH4_3g34540.1	-3,46	0,0044133	FvH4_2g23930.1	-2,10	1,4521E-21	FvH4_3g30620.1	-1,55	3,6848E-06
FvH4_2g38340.1	-3,45	0,0022393	FvH4_1g21780.1	-2,09	0,00014431	FvH4_5g07590.1	-1,54	0,0099864
FvH4_3g23040.1	-3,42	1,3638E-06	FvH4_4g22140.1	-2,08	0,0033915	FvH4_1g03010.1	-1,54	0,020161
FvH4_6g51170.1	-3,36	0,0085875	FvH4_3g27480.1	-2,07	3,5898E-10	FvH4_4g10460.1	-1,54	6,1117E-09
FvH4_5g03430.1	-3,33	0,041055	FvH4_3g16930.1	-2,06	0,045601	FvH4_1g24000.1	-1,54	1,8954E-06
FvH4_6g30170.1	-3,29	0,031231	FvH4_2g24940.1	-2,05	0,0043789	FvH4_6g14150.1	-1,53	4,8178E-06
FvH4_7g15490.1	-3,25	1,6878E-05	FvH4_4g19540.1	-2,05	0,0042325	FvH4_3g01340.1	-1,53	0,017613
FvH4_4g19020.1	-3,22	1,3842E-12	FvH4_1g17120.1	-2,05	0,019279	FvH4_5g38350.1	-1,52	0,00067073
FvH4_2g18080.1	-3,20	2,8432E-09	FvH4_6g32270.1	-2,04	0,026471	FvH4_3g39550.1	-1,52	0,00052336
FvH4_7g16550.1	-3,20	0,0024589	FvH4_5g39020.1	-2,04	1,8954E-06	FvH4_1g18230.1	-1,51	0,024845
FvH4_6g14500.1	-3,20	0,004854	FvH4_5g35490.1	-2,03	0,024826	FvH4_2g22500.1	-1,51	0,017421
FvH4_6g07930.1	-3,18	0,0014763	FvH4_5g11540.1	-2,03	8,3871E-11	FvH4_2g15210.1	-1,50	0,040437
FvH4_7g24650.1	-3,17	0,00021	FvH4_7g26030.1	-2,02	0,00037687	FvH4_6g29800.1	-1,50	0,00032086
FvH4_5g08530.1	-3,16	0,012021	FvH4_1g07080.1	-2,02	0,0035464			
FvH4_5g10380.1	-3,16	0,027312	FvH4_7g22740.1	-2,02	0,00039388			
FvH4_2g21450.1	-3,11	0,0093983	FvH4_6g14410.1	-2,01	0,048804			
FvH4_1g27870.1	-3,11	1,6323E-13	FvH4_7g33050.1	-2,01	0,035597			
FvH4_7g23650.1	-3,09	0,030027	FvH4_1g10770.1	-2,01	0,035845			
FvH4_5g14760.1	-3,08	2,2213E-32	FvH4_2g02600.1	-2,00	2,9393E-06			
FvH4_3g09050.1	-3,04	2,8949E-07	FvH4_7g10850.1	-1,98	1,4745E-05			

FvH4_5g03960.1	-3,03	0,0018401	FvH4_4g35530.1	-1,98	0,00025216		
FvH4_3g22640.1	-3,01	0,00012025	FvH4_5g04580.1	-1,97	6,2811E-05		
FvH4_1g23480.1	-3,01	0,033576	FvH4_6g13730.1	-1,96	0,0024969		
FvH4_7g31050.1	-3,00	0,011571	FvH4_6g31430.1	-1,96	0,00001954		
FvH4_6g47010.1	-2,99	0,019146	FvH4_1g07560.1	-1,94	0,00048759		
FvH4_3g10570.1	-2,99	0,0057538	FvH4_3g20670.1	-1,93	0,027338		
FvH4_6g05020.1	-2,99	5,2572E-06	FvH4_4g19120.1	-1,93	3,8821E-15		
FvH4_4g33190.1	-2,91	4,8951E-18	FvH4_4g31640.1	-1,91	1,1178E-09		
FvH4_4g32800.1	-2,90	0,00063456	FvH4_3g13300.1	-1,91	8,3451E-10		
FvH4_4g26630.1	-2,90	0,036653	FvH4_3g12030.1	-1,91	0,037065		
FvH4_7g20380.1	-2,90	0,0056756	FvH4_6g37200.1	-1,91	0,0041929		
FvH4_3g21020.1	-2,89	0,040097	FvH4_5g03710.1	-1,90	1,4426E-05		
FvH4_6g25830.1	-2,89	5,1896E-05	FvH4_4g10980.1	-1,89	0,017566		
FvH4_6g45100.1	-2,89	0,011754	FvH4_6g20400.1	-1,89	0,021199		
FvH4_7g28960.1	-2,89	0,0053996	FvH4_2g19810.1	-1,89	0,0033857		
FvH4_7g04980.1	-2,88	0,016098	FvH4_6g26680.1	-1,88	2,7436E-05		
FvH4_1g30410.1	-2,86	1,1883E-06	FvH4_5g36560.1	-1,87	1,0285E-05		
FvH4_3g45190.1	-2,86	3,7914E-06	FvH4_3g25740.1	-1,86	0,017908		
FvH4_4g28030.1	-2,83	0,0049216	FvH4_2g31220.1	-1,85	0,00026558		
FvH4_7g22750.1	-2,82	0,01241	FvH4_4g19830.1	-1,85	0,00098127		
FvH4_7g11320.1	-2,80	0,024542	FvH4_6g39680.1	-1,84	2,6742E-08		
FvH4_5g03460.1	-2,80	8,4219E-07	FvH4_5g03330.1	-1,84	0,020548		
FvH4_6g15920.1	-2,80	0,031861	FvH4_4g33930.1	-1,83	0,00021891		
FvH4_1g15390.1	-2,78	0,024854	FvH4_5g15610.1	-1,82	3,3293E-08		
FvH4_4g40530.1	-2,75	0,0034589	FvH4_6g07140.1	-1,82	6,3779E-07		
FvH4_4g03470.1	-2,75	0,043064	FvH4_2g01740.1	-1,82	4,8172E-07		
FvH4_1g10430.1	-2,71	0,00041078	FvH4_6g04150.1	-1,81	0,013985		
FvH4_4g02870.1	-2,70	0,0015738	FvH4_5g16240.1	-1,81	0,025371		
FvH4_4g01690.1	-2,69	2,7938E-05	FvH4_7g19800.1	-1,80	6,2477E-10		
FvH4_7g31940.1	-2,68	0,032275	FvH4_5g37970.1	-1,80	0,0033654		
FvH4_5g05180.1	-2,67	1,2309E-06	FvH4_3g01940.1	-1,80	0,0014314		
FvH4_7g22340.1	-2,66	0,0163	FvH4_3g28340.1	-1,80	0,017427		
FvH4_6g35500.1	-2,66	1,5308E-06	FvH4_1g15230.1	-1,80	0,045363		
FvH4_3g01170.1	-2,66	7,4106E-05	FvH4_7g14640.1	-1,79	3,6148E-10		
FvH4_3g16360.1	-2,65	0,019214	FvH4_4g28390.1	-1,78	0,037552		
FvH4_7g31950.1	-2,63	0,0016556	FvH4_6g14630.1	-1,78	2,3485E-06		
FvH4_7g22580.1	-2,62	8,8585E-09	FvH4_3g42220.1	-1,78	0,00053243		
FvH4_4g33130.1	-2,62	0,0086635	FvH4_2g05920.1	-1,77	0,022324		
FvH4_6g45240.1	-2,62	0,014378	FvH4_6g40200.1	-1,77	0,00039388		
FvH4_6g07920.1	-2,60	0,030865	FvH4_3g05980.1	-1,77	0,03898		
FvH4_1g03420.1	-2,59	5,9836E-05	FvH4_7g02540.1	-1,77	0,00051409		
FvH4_7g32030.1	-2,58	0,048336	FvH4_4g08550.1	-1,76	3,6944E-05		
FvH4_4g35930.1	-2,58	0,0001587	FvH4_4g35180.1	-1,75	0,030304		
FvH4_5g28010.1	-2,58	0,00067764	FvH4_6g31930.1	-1,75	0,028576		
FvH4_7g12700.1	-2,56	0,015143	FvH4_6g32710.1	-1,75	0,012783		
FvH4_2g02050.1	-2,56	0,037397	FvH4_3g39130.1	-1,75	0,00018914		
FvH4_4g16950.1	-2,55	0,0003936	FvH4_1g08580.1	-1,74	0,0071426		
FvH4_2g33680.1	-2,55	0,00001729	FvH4_3g14720.1	-1,74	3,3755E-05		
FvH4_7g15780.1	-2,54	0,039475	FvH4_5g38040.1	-1,74	8,3871E-11		
FvH4_4g33970.1	-2,54	0,012015	FvH4_6g20130.1	-1,73	0,010114		
FvH4_4g11420.1	-2,53	0,00000011	FvH4_1g04810.1	-1,73	0,0021075		
FvH4_6g40520.1	-2,53	0,0097121	FvH4_7g04990.1	-1,73	0,016181		
FvH4_4g19510.1	-2,52	5,9E-08	FvH4_6g07300.1	-1,73	9,2257E-12		
FvH4_3g27290.1	-2,49	0,0048986	FvH4_4g36120.1	-1,73	1,2178E-05		
FvH4_3g38620.1	-2,48	0,014117	FvH4_2g04790.1	-1,72	0,012021		
FvH4_1g09820.1	-2,48	0,00088585	FvH4_1g09480.1	-1,71	1,479E-06		
FvH4_4g30710.1	-2,47	0,027312	FvH4_1g13260.1	-1,71	0,00023412		
FvH4_4g32600.1	-2,47	0,0028272	FvH4_2g16960.1	-1,71	0,027813		
FvH4_6g03820.1	-2,47	9,3893E-12	FvH4_6g31900.1	-1,70	0,0023883		
FvH4_1g17130.1	-2,46	0,0032457	FvH4_3g01130.1	-1,70	0,014915		

**CELLO RESULTS**

SeqID: FaNAC2

Analysis Report:

SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Nuclear	0.815
N-peptide Comp.	Nuclear	0.924
Partitioned seq. Comp.	Nuclear	0.893
Physico-chemical Comp.	Nuclear	0.507
Neighboring seq. Comp.	Nuclear	0.865

CELLO Prediction:

Nuclear	4.004 *
Extracellular	0.326
Cytoplasmic	0.231
Lysosomal	0.140
Mitochondrial	0.105
Chloroplast	0.050
Vacuole	0.047
PlasmaMembrane	0.044
ER	0.032
Peroxisomal	0.010
Cytoskeletal	0.006
Golgi	0.006

\*\*\*\*\*

[\[ Home | Documentation \]](#)

**CELLO RESULTS**

SeqID: FaNAC3

Analysis Report:

SVM	LOCALIZATION	RELIABILITY
Amino Acid Comp.	Nuclear	0.413
N-peptide Comp.	Nuclear	0.492
Partitioned seq. Comp.	Nuclear	0.799
Physico-chemical Comp.	Nuclear	0.910
Neighboring seq. Comp.	Nuclear	0.890

CELLO Prediction:

Nuclear	3.504 *
Chloroplast	0.467
Cytoplasmic	0.391
Extracellular	0.306
Mitochondrial	0.232
Peroxisomal	0.025
ER	0.021
Vacuole	0.014
PlasmaMembrane	0.013
Golgi	0.010
Cytoskeletal	0.009
Lysosomal	0.009

\*\*\*\*\*

[\[ Home | Documentation \]](#)

Figura Suplementaria 2.1: Predicción de localización subcelular de FaNAC2 y FaNAC3 con el software Cello. Junto a cada posibilidad de localización subcelular aparece la fiabilidad, indicando con un asterisco las posibilidades más probables en base a la secuencia de las proteínas estudiadas.

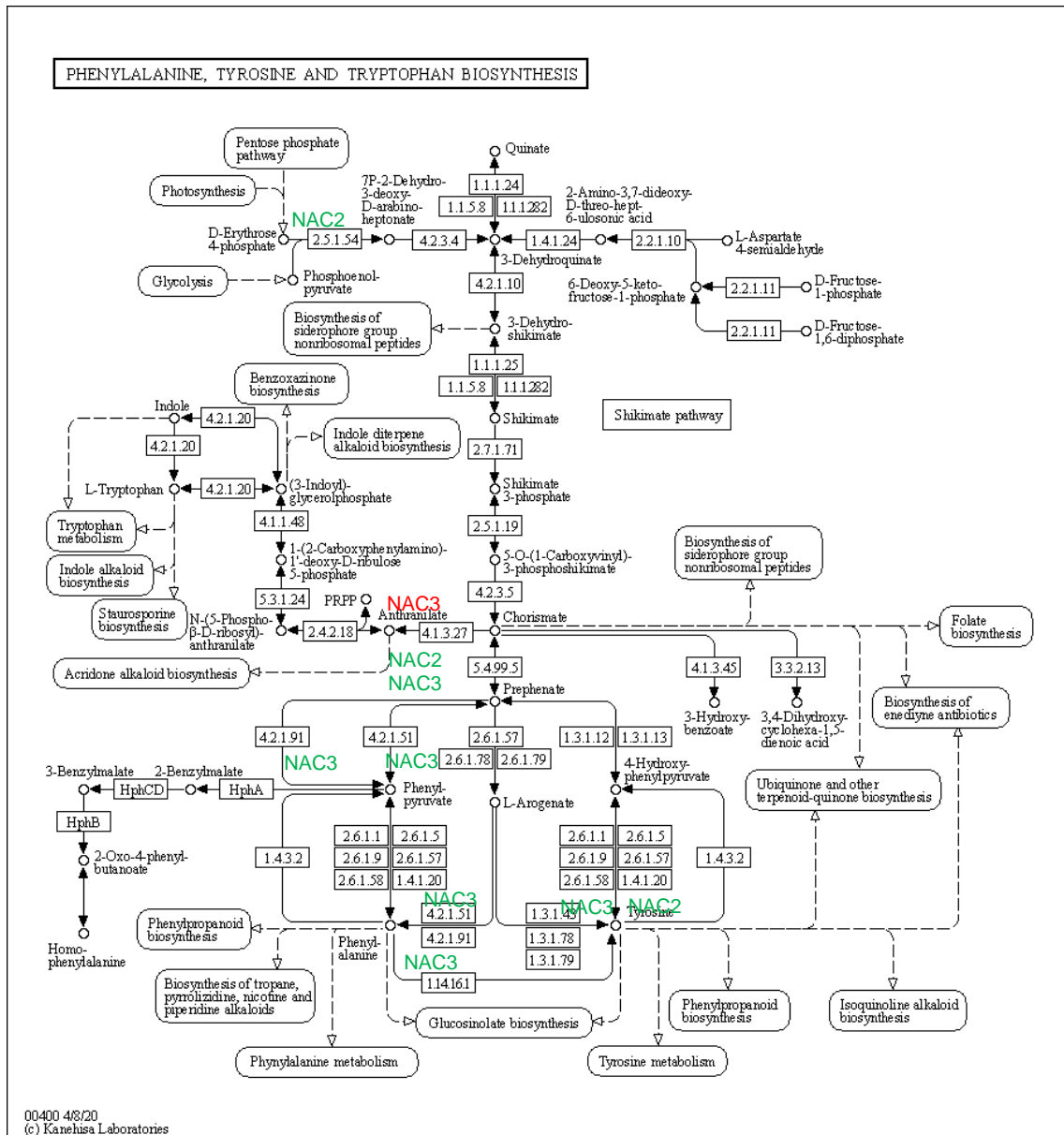


Figura Suplementaria 2.2: Alteraciones en la expresión génica de la ruta biosintética de la fenilalanina, tirosina y triptófano en frutos de la línea FaNAC2 11 (NAC2) y FaNAC3 3 (NAC3) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.

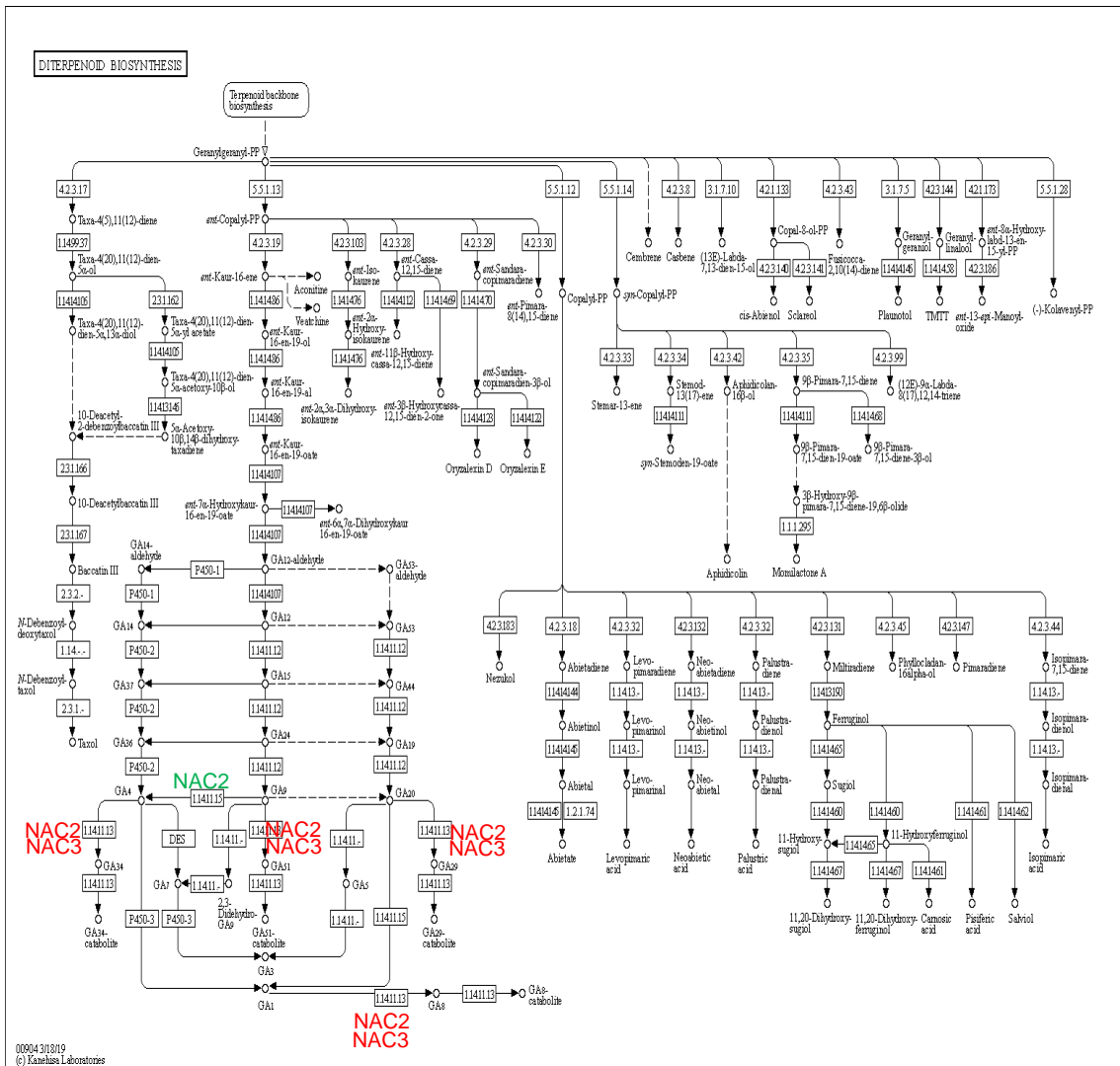


Figura Suplementaria 2.3: Alteraciones en la expresión génica de la ruta biosintética de los diterpenoides en frutos de la línea FaNAC2 11 (NAC2) y FaNAC3 3 (NAC3) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.

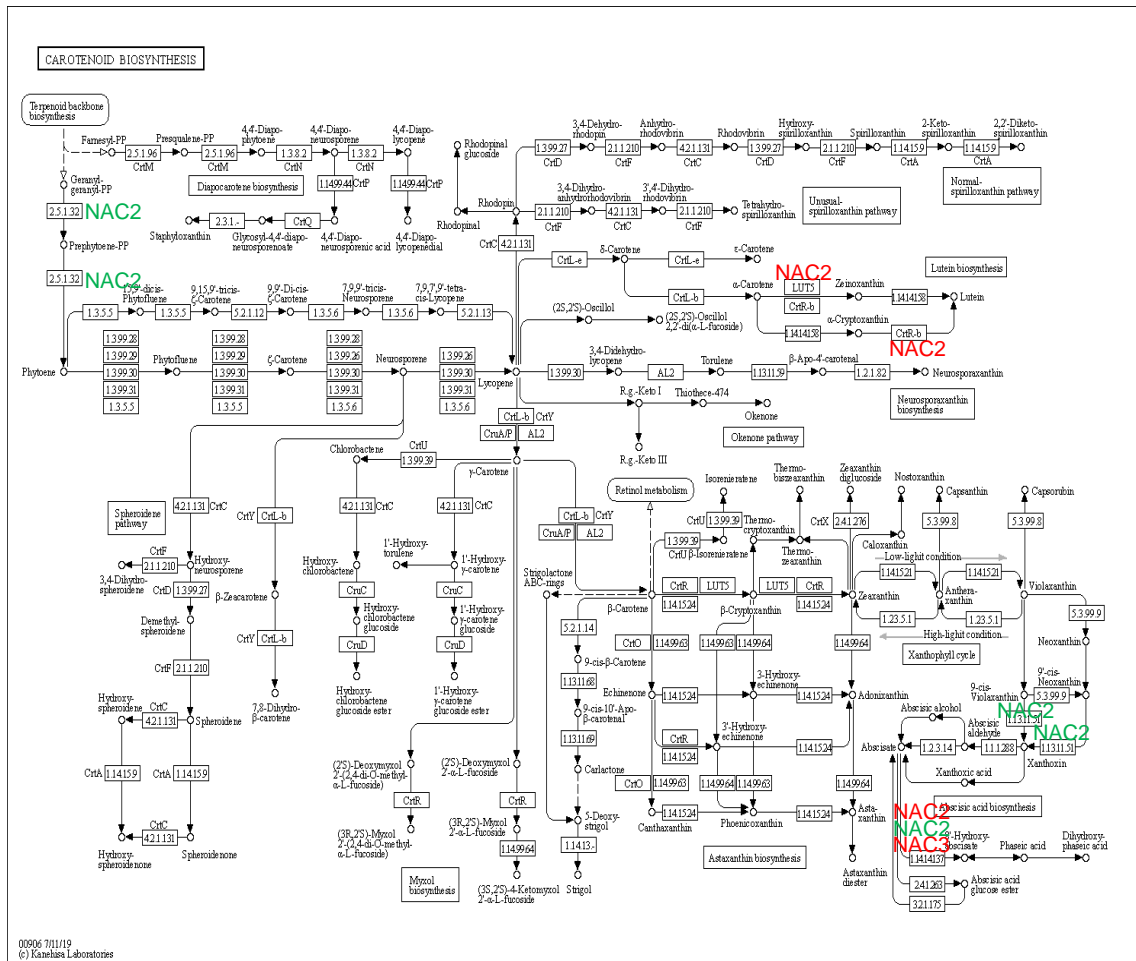


Figura Suplementaria 2.4: Alteraciones en la expresión génica de la ruta biosintética de los carotenoides en frutos de la línea FaNAC2 11 (NAC2) y FaNAC3 3 (NAC3) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.



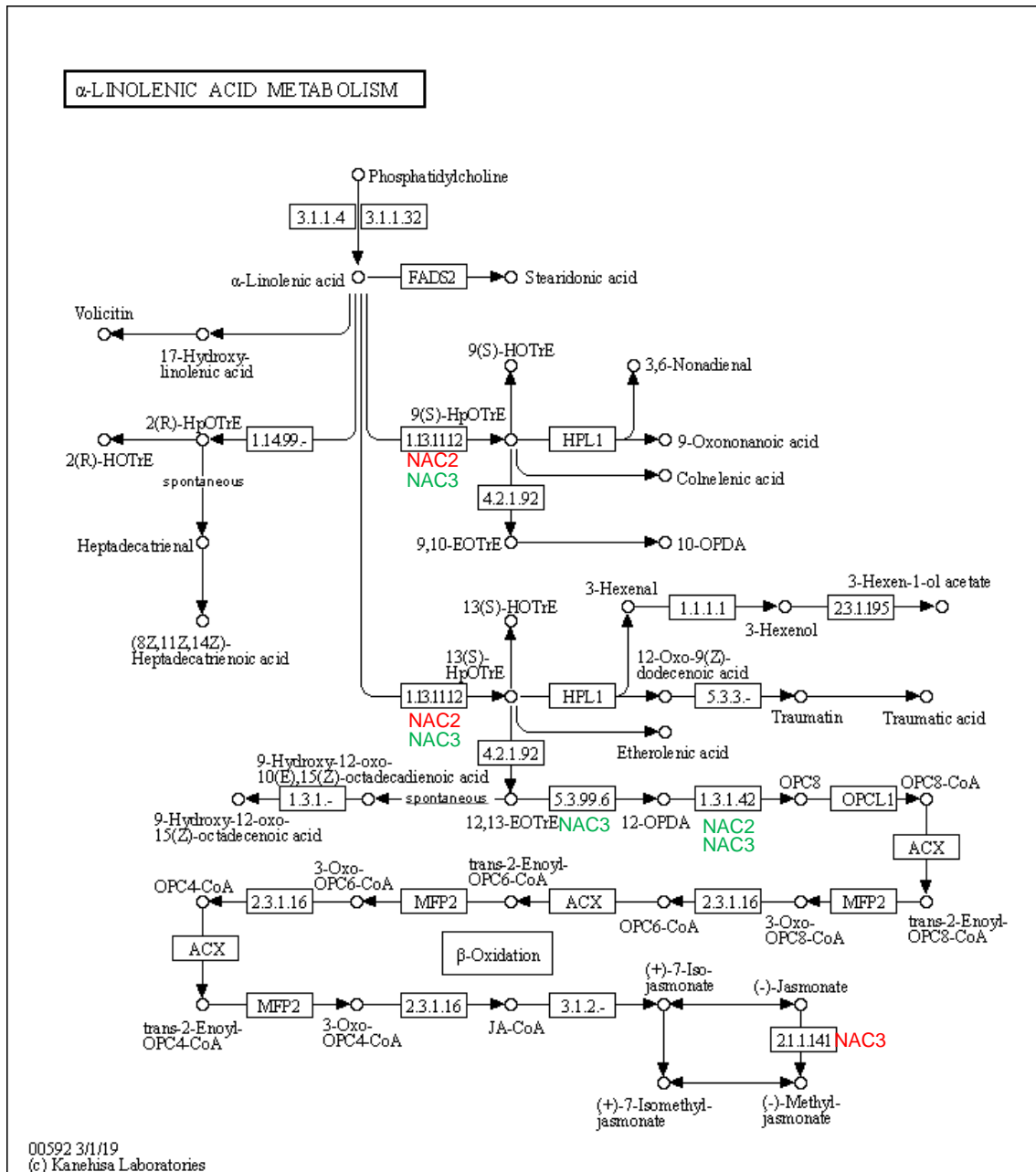


Figura Suplementaria 2.6: Alteraciones en la expresión génica de la ruta metabólica del ácido α-linolénico en frutos de la línea FaNAC2 11 (NAC2) y FaNAC3 3 (NAC3) en un mapa metabólico extraído de la base de datos KEGG. Color rojo indica aumento de expresión y color verde reducción de la expresión.



Tabla Suplementaria 3.1: lista de genes que muestran una expresión diferencial en los frutos de la línea FaRG 26 con respecto a los frutos control. Se indica también el “Gene\_id” que indica la referencia del gen en la base de datos de Rosaceae; el “readcount” que muestra el número de lecturas asociadas a ese gen tanto en la línea transgénica (RG26) como en la línea control (WT); el “log<sub>2</sub> del fold change” que nos muestra la diferencia de expresión con respecto al control; el P-value (pval) sin ajustar; el P-value ajustado por el método Benjamini y Hochberg (padj); y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Genes con baja expresión en frutos de la línea FaRG 26							
Gene_id	readcount_RG26	readcount_WT	log2FoldChange	pval	padj	expression (%)	
FvH4_1g03290.1	60,46279628	419,0063058	-2,7929	7,23E-19	5,21E-15	14,43	
FvH4_1g03300.1	982,3656105	6333,460239	-2,6887	5,48E-23	5,91E-19	15,51	
FvH4_3g27340.1	30,56638937	86,5348727	-1,5013	0,0001862	0,039414	35,32	
FvH4_4g01980.1	122,8614409	286,4759114	-1,2214	0,0002329	0,046148	42,89	
FvH4_4g11660.1	31,44700939	94,64480615	-1,5896	3,23E-05	0,0098353	33,23	
FvH4_4g19830.1	109,4035251	492,4417769	-2,1703	1,54E-05	0,0051956	22,22	
FvH4_5g02700.1	8,217967631	81,91670345	-3,3173	0,0001536	0,033898	10,03	
FvH4_5g13850.1	41,07799453	173,306831	-2,0769	1,925E-06	3,20E-06	23,70	
FvH4_5g28010.1	4,908912871	50,75797331	-3,3702	1,49E-06	0,00080586	9,67	
FvH4_6g25830.1	2,091218769	32,43876127	-3,9553	8,29E-08	8,95E-05	6,45	
FvH4_6g25940.1	65,9342814	202,9774482	-1,6222	6,06E-07	0,00039146	32,48	
FvH4_6g45640.1	10,81821045	61,50805955	-2,5073	8,90E-07	0,00051967	17,59	
FvH4_6g49960.1	36,59406894	101,6944606	-1,4746	8,02E-05	0,020775	35,98	
FvH4_6g53690.1	17,78466462	58,95849628	-1,7291	0,0001111	0,02608	30,16	
FvH4_7g05780.1	82,70427852	198,7713861	-1,2651	6,12E-05	0,017376	41,61	
FvH4_7g05890.1	57,07835947	140,835681	-1303	0,0001663	0,035923	40,53	
FvH4_7g05910.1	5,454803289	39,76159744	-2,8658	1,57E-06	0,00082549	13,72	
FvH4_7g05920.1	5,555521891	64,01969988	-3,5265	3,18E-11	6,98E-08	8,68	
FvH4_7g06410.1	25,83263038	116,6170167	-2,1745	7,58E-08	8,61E-05	22,15	
FvH4_7g06420.1	1,360572979	27,95225312	-4,3607	0,0002144	0,04328	4,87	
Genes con alta expresión en frutos de la línea FaRG 26							
Gene_id	readcount_RG26	readcount_WT	log2FoldChange	pval	padj	expression (%)	
FvH4_1g00150.1	113,6995118	42,91706282	1,4056	0,0001252	0,029079	264,93	
FvH4_1g05080.1	401,5735989	151,9544978	1402	2,47E-06	0,0012109	264,27	
FvH4_1g05100.1	847,4708083	222,467812	1,9296	1,31E-05	0,0045609	380,94	
FvH4_1g12110.1	303,963688	126,1483461	1,2688	2,64E-05	0,0082644	240,96	
FvH4_1g13420.1	75,24614988	23,28982612	1,6919	6,28E-05	0,017376	323,09	
FvH4_1g14300.1	91,86810109	27,01811711	1,7656	9,98E-06	0,0037153	340,02	
FvH4_1g14900.1	63,78534397	19,85899222	1,6834	0,0001864	0,039414	321,19	
FvH4_1g16030.1	1283,435055	555,1807473	1209	1,10E-05	0,0039562	231,17	
FvH4_1g18170.1	1436,372809	383,1604542	1,9064	4,14E-09	1,28E-08	374,88	
FvH4_1g20090.1	80,11733694	17,59056812	2,1873	2,38E-07	0,00019028	455,46	
FvH4_1g20580.1	810,8928206	213,5612925	1,9249	0,0002517	0,048106	379,70	
FvH4_1g21540.1	322,3278108	91,672798	1814	3,54E-05	0,010616	351,61	
FvH4_1g23750.1	3039,171537	958,4219339	1,6649	9,19E-06	0,0036751	317,10	
FvH4_2g05000.1	147,9945942	34,20988862	2,1131	0,0001516	0,033898	432,61	
FvH4_2g06450.1	749,5660166	353,5121459	1,0843	0,000188	0,039414	212,03	
FvH4_2g09920.1	586,2264351	203,8091954	1,5242	3,64E-07	0,00026227	287,63	
FvH4_2g21540.1	546,2485776	175,1214263	1,6412	1,94E-08	2,46E-05	311,93	
FvH4_2g22170.1	260,0575732	89,8960021	1,5325	8,65E-06	0,0035258	289,29	
FvH4_2g29820.1	52,08528771	2,678897828	4,2812	7,95E-07	0,00049052	1944,28	
FvH4_2g31570.1	104,5020466	23,66531057	2,1427	9,62E-08	9,89E-05	441,58	
FvH4_2g32830.1	59,30299276	17,44449653	1,7653	8,74E-05	0,021952	339,95	
FvH4_2g34690.1	37,95479882	8,810207693	2107	0,0002056	0,04229	430,80	
FvH4_2g34770.1	369,6201214	98,34281469	1,9102	3,50E-09	4,73E-06	375,85	
FvH4_2g34940.1	155,7226935	51,95902603	1,5835	5,33E-06	0,0023975	299,70	
FvH4_2g35160.1	46,29976838	11,83228186	1,9683	0,0001081	0,02575	391,30	

FvH4_2g40480.1	125,4164416	34,96975531	1,8425	8,29E-07	0,00049717	358,64
FvH4_3g08290.1	151,9575701	60,47423747	1,3293	0,0001301	0,029888	251,28
FvH4_3g10940.1	45,4767449	11,22876003	2,0179	0,0001085	0,02575	405,00
FvH4_3g10950.1	289,3421522	125,3030856	1,2074	6,59E-05	0,017951	230,91
FvH4_3g13060.1	387,7513646	155,6804462	1,3165	2,57E-05	0,0081679	249,07
FvH4_3g15240.1	2201,226145	695,0606605	1,6631	5,76E-07	0,00038867	316,70
FvH4_3g15270.1	467,9512753	136,9248892	1773	1,45E-07	0,00013189	341,76
FvH4_3g17480.1	1047,968742	333,9242613	1,65	2,58E-09	3,98E-06	313,83
FvH4_3g21380.1	80,30142457	12,15057026	2,7244	1,61E-06	0,0008286	660,89
FvH4_3g25740.1	77,85516954	25,48981375	1,6109	8,08E-05	0,020775	305,44
FvH4_3g26010.1	1219,722929	249,8548799	2,2874	0,0002513	0,048106	488,17
FvH4_3g28370.1	1505,74762	369,7832286	2,0257	6,45E-10	1,16E-06	407,20
FvH4_3g31680.1	439,3810195	76,6754814	2,5186	3,23E-11	6,98E-08	573,04
FvH4_3g33510.1	417,7487343	163,6960182	1,3516	0,02936	0,009058	255,20
FvH4_3g36960.1	376,0416791	126,9009645	1,5672	1,10E-05	0,0039562	296,33
FvH4_3g41150.1	461,4205136	137,2268435	1,7495	3,40E-09	4,73E-06	336,25
FvH4_3g43440.1	124,151749	47,57852267	1,3837	0,000154	0,033898	260,94
FvH4_3g44730.1	7129,94719	2802,757943	1347	1,74E-07	0,00014491	254,39
FvH4_3g45520.1	179,5946446	27,52636413	2,7059	1,39E-13	5,99E-10	652,45
FvH4_4g04710.1	293,7154787	96,32425862	1,6084	3,64E-07	0,00026227	304,92
FvH4_4g05940.1	25,28575841	3,569028594	2,8247	0,000104	0,02553	708,48
FvH4_4g15150.1	1598,685066	378,8390973	2,0772	0,0006163	0,00039146	422,00
FvH4_4g19050.1	34004,23189	10810,76363	1,6532	1,47E-07	0,00013189	314,54
FvH4_4g19060.1	3506,697465	1294,762082	1,4374	2,69E-06	0,0012915	270,84
FvH4_4g19070.1	5881,09886	1585,041894	1,8916	4,80E-06	0,0022049	371,04
FvH4_4g19080.1	1391,043224	403,1194602	1,7869	0,0002559	0,00019737	345,07
FvH4_4g19700.1	1797,233684	440,7568622	2,0277	7,33E-05	0,01931	407,76
FvH4_4g20640.1	959,4486987	247,8274745	1,9529	1,54E-10	3,02E-07	387,14
FvH4_4g24080.1	857,6607107	204,8104032	2,0661	1,07E-07	0,00010545	418,76
FvH4_4g24660.1	48,77009938	13,61722869	1,8406	0,0002006	0,041652	358,15
FvH4_4g30150.1	431,9803376	106,4840354	2,0203	2,87E-11	6,98E-08	405,68
FvH4_4g35980.1	68,0487515	20,22288166	1,7506	7,25E-05	0,01931	336,49
FvH4_5g02050.1	446,4655489	139,7272972	1,6759	3,15E-06	0,0014771	319,53
FvH4_5g10430.1	108,9127627	29,06488702	1,9058	0,0002097	0,042725	374,72
FvH4_5g11930.1	242,9414264	86,94789863	1,4824	0,08248	0,020956	279,41
FvH4_5g15610.1	1118,140933	434,1347301	1,3649	6,47E-06	0,0027958	257,56
FvH4_5g16930.1	147,5243176	38,34402179	1,9439	1,60E-07	0,00013808	384,74
FvH4_5g29210.1	47,89754126	1,309738664	5,1926	3,11E-13	1,12E-09	3657,03
FvH4_5g38050.1	9896,935641	3107,608151	1,6712	9,94E-06	0,0037153	318,47
FvH4_6g00830.1	249,2206358	2,685178915	6,5363	4,06E-43	8,77E-39	9281,34
FvH4_6g09300.1	105,5687699	26,48793734	1,9948	8,49E-06	0,0035246	398,55
FvH4_6g10350.1	182,2803818	64,24048902	1,5046	5,96E-06	0,0026284	283,75
FvH4_6g12390.1	1445,619699	596,7327452	1,2765	9,39E-06	0,003688	242,26
FvH4_6g16950.1	4175,198946	678,6060078	2,6212	6,21E-05	0,017376	615,26
FvH4_6g18770.1	598,6872245	103,819274	2,5277	2,00E-17	1,08E-13	576,66
FvH4_6g18810.1	395,5967145	171,942298	1,2021	0,000259	0,049062	230,08
FvH4_6g20940.1	62,23265626	15,29542387	2,0246	1,51E-05	0,0051897	406,87
FvH4_6g24120.1	342,6655879	130,9605467	1,3877	2,38E-05	0,0076636	261,66
FvH4_6g27880.1	175,8022563	62,76817816	1,4858	1,24E-05	0,0043856	280,08
FvH4_6g29770.1	322,0241154	99,45714107	1695	4,02E-07	0,00027986	323,78
FvH4_6g32710.1	1181,57964	431,3658768	1,4537	1,46E-06	0,00080586	273,92
FvH4_6g38750.1	63,58083998	17,54866912	1,8572	3,92E-05	0,011584	362,31
FvH4_6g39410.1	7277,378488	2601,656263	1484	3,08E-08	3,69E-05	279,72
FvH4_6g39840.1	998,582136	268,9647355	1,8925	6,65E-05	0,017951	371,27
FvH4_6g39850.1	891,3289327	242,3725234	1,8787	9,53E-07	0,00054181	367,75

FvH4_6g39920.1	13,60863967	0	Inf		8,45E-06	0,0035246	
FvH4_6g42090.1	15910,04006	6606,332544		1268	9,83E-05	0,024402	240,83
FvH4_6g45140.1	108,0748636	43,40654715		1316	0,0002449	0,047646	248,98
FvH4_7g01400.1	332,4042397	146,145361		1,1855	5,34E-05	0,015384	227,45
FvH4_7g03520.1	132,5677733	46,09879163		1,5239	0,0002205	0,044098	287,57
FvH4_7g15780.1	2635,20366	687,911121		1,9376	0,0001505	0,033898	383,07
FvH4_7g23180.1	119,2090366	45,32266074		1,3952	0,0001075	0,02575	263,02
FvH4_7g26000.1	744,2997859	246,7939747		1,5926	4,50E-05	0,013139	301,59
FvH4_7g26920.1	1026,850371	518,6631844		0,98536	0,0002361	0,046359	197,98
FvH4_7g27120.1	81,76562603	27,91897785		1,5502	0,0001554	0,033898	292,87
FvH4_7g29560.1	153,3107436	32,27459327		2248	2,13E-05	0,0069649	475,02
FvH4_7g30570.1	58,89968242	11,86014109		2,3121	1,70E-06	0,0008519	496,62
FvH4_7g30730.1	392,9221987	107,2905508		1,8727	9,87E-06	0,0037153	366,22
FvH4_7g33750.1	114,4017543	19,05305169		2586	1,82E-05	0,0060619	600,44

Tabla Suplementaria 3.2: lista de genes que muestran una expresión diferencial en los frutos de la línea FaRG 87 con respecto a los frutos control. Se indica también el “Gene\_id” que indica la referencia del gen en la base de datos de Rosaceae; el “readcount” que muestra el número de lecturas asociadas a ese gen tanto en la línea transgénica (RG87) como en la línea control (WT); el “log<sub>2</sub> del fold change” que nos indica la diferencia de expresión con respecto al control; el P-value (pval) sin ajustar; el P-value ajustado por el método Benjamini y Hochberg (padj); y el porcentaje de expresión con respecto a los frutos control.

Genes con baja expresión en frutos de la línea FaRG 87						
Gene_id	readcount_RG87	readcount_WT	log2FoldChange	pval	padj	expression (%)
FvH4_1g03290.1	74,06260746	402,7783522	-2,4432	3,63E-11	2,65E-07	18,39
FvH4_1g03300.1	1195,059059	6088,223607	-2,3489	4,57E-13	5,01E-09	19,63
FvH4_1g04050.1	141,9817163	468,6644768	-1,7229	1,25E-06	0,0034266	30,29
FvH4_1g18970.1	2824,52691	7940,542213	-1,4912	2,19E-06	0,0053208	35,57
FvH4_3g36040.1	496,4933073	24472,27291	-5,6232	1,68E-09	7,34E-06	2,03
FvH4_3g36840.1	0,334513064	38,473273	-6,8457	2,32E-05	0,042426	0,87
FvH4_5g24610.1	2,254406928	74,11799454	-5,039	1,38E-10	7,53E-07	3,04
FvH4_7g02540.1	22,55967413	183,6968772	-3,0255	3,12E-09	1,14E-05	12,28
Genes con alta expresión en frutos de la línea FaRG 87						
Gene_id	readcount_RG87	readcount_WT	log2FoldChange	pval	padj	expression (%)
FvH4_1g09170.1	21,38848958	0,881044457	4,6015	0,01634	0,032536	2427,63
FvH4_1g20320.1	34,45531116	2,61877438	3,7178	1,49E-05	0,032536	1315,70
FvH4_5g29210.1	90,81027713	1,258778583	6,1728	6,04E-19	1,32E-14	7214,16
FvH4_6g39920.1	19,17808468	0	Inf		7,43E-07	0,0023235

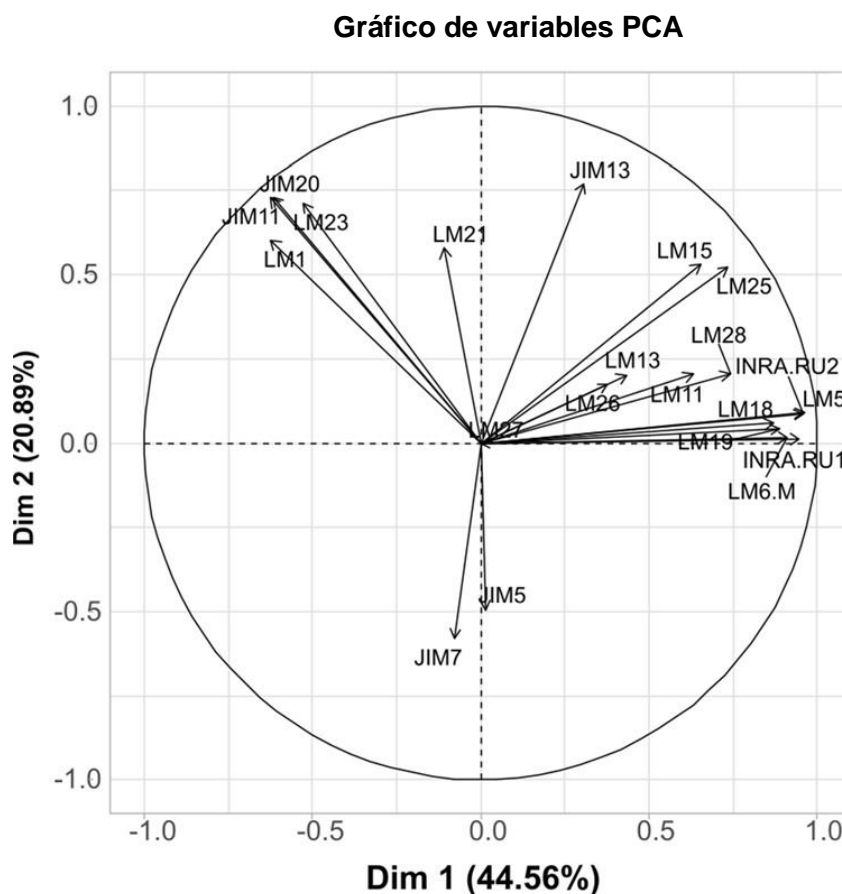


Figura Suplementaria 4.1: Mapa de variables obtenido en el análisis PCA de todo el conjunto de datos del microarrays de carbohidratos.

Tabla Suplementaria 4.1: Lista de anticuerpos monoclonales usados en el microarrays de polisacáridos y los epítomos reconocidos por cada anticuerpo.

Anticuerpo	Epítomo de pared celular	Referencia
LM18	Parcialmente Me-HG / no éster	Verhertbruggen et al. (2009) Carbohydr. Res. 344, 1858
LM19	Parcialmente Me-HG / no éster	Verhertbruggen et al. (2009) Carbohydr. Res. 344, 1858
LM20	Parcialmente Me-HG	Verhertbruggen et al. (2009) Carbohydr. Res.344, 1858
JIM5	Parcialmente Me-HG / no éster	Knox et al. (1990) Planta 181, 512-521
JIM7	Parcialmente Me-HG	Knox et al. (1990) Planta 181, 512-521
LM5	(1→4)-β-D-galactano	Jones et al. (1997) Plant Physiol. 113, 1405-1412
LM6-M/BR12	(1→5)-α-L-arabinano	Cornuault et al. (2017) BiorXiv:

INRA-RU1	[→2)- $\alpha$ -L-ramnosa- (1→4)- $\alpha$ -D-ácido galacturónico-(1→]7	doi.org/10.1101/161604 Ralet et al. (2010) Planta 231, 1373-1383
INRA-RU2	[→2)- $\alpha$ -L-ramnosa- (1→4)- $\alpha$ -D-ácido galacturónico-(1→]7	Ralet et al. (2010) Planta 231, 1373-1383
LM13	(1→5)- $\alpha$ -L-arabinano linealizado	Moller et al. (2008) Glycoconjugate J. 25, 37-48
LM26	Galactano ramificado	Torode et al. (2018) Plant Physiol. 176, 1547-1558
LM15	Xiloglucano (motivo XXXG)	Marcus et al. (2008) BMC Plant Biol. 8, 60
LM25	Xiloglucano (XXXG/galactosilado)	Pedersen et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 39429-39438
LM10	(1→4)- $\beta$ -D-xilano	McCartney et al. (2005) J. Histochem Cytochem 53, 543
LM11	(1→4)- $\beta$ -D-xilano/arabinoxilano	McCartney et al. (2005) J. Histochem Cytochem 53, 543
LM23	Xilosil no acetilado	Manabe et al. (2011) Plant Physiol. 155, 1068-1078
LM28	Glucuronoxilano	Cornuault et al. (2015) Planta 242, 1321-1334
LM1	Extensina	Smallwood et al. (1995) Planta 196, 510-522
JIM11	Extensina	Smallwood et al. (1994) Plant J. 5, 237-246
JIM20	Extensina	Smallwood et al. (1994) Plant J. 5, 237-246
JIM13	Glicano AGP	Knox, et al. (1991) Plant J. 1, 317-326
PDT8	AGP	Cornuault (2014) <a href="http://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/8598">http://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/8598</a>
LM2	Enlace $\beta$ -GlcA en AGP	Smallwood et al. (1996) Planta 198, 452-459
LM21	Heteromananos	Marcus et al. (2010) Plant J. 64, 191-203
LM27	Heteroxilano de monocotiledóneas	Cornuault et al. (2015) Planta 242, 1321-1334
10H2D12	Calosa	En proceso de publicación

