



Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria,
Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA FLORACIÓN Y EL ESTOLONADO EN FRESA

(*Fragaria × ananassa* Duch.)

Tesis Doctoral

Julio Carlos Muñoz Avila

**Laboratorio de Biotecnología en Fresa
Area de Mejora y Biotecnología de Cultivos**


IFAPA – Centro de Churriana

Universidad de Málaga, Noviembre 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Julio Carlos Muñoz Ávila

 <http://orcid.org/0000-0002-8634-3770>

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



Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria,
Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

IRAIDA AMAYA SAAVEDRA, Investigadora contratada del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Junta de Andalucía, y **JOSÉ FEDERICO SÁNCHEZ SEVILLA**, Investigador del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Junta de Andalucía, directores del trabajo realizado por el Licenciado en Biología **Julio Carlos Muñoz Ávila**,

CERTIFICAN: que la memoria titulada “**Identificación y caracterización de genes implicados en la floración y el estolonado en fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.)**”, que presenta el licenciado Julio Carlos Muñoz Ávila, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor. Y para que conste a efectos de lo establecido en el artículo 18 del Real Decreto 1393/2007, regulador de las Enseñanzas de Doctorado, **autorizamos** la presentación de esta Tesis en la Universidad de Málaga.

Málaga de Septiembre de 2016

Fdo.: Iraida Amaya Saavedra

Fdo.: José Federico Sánchez Sevilla



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Victoriano Valpuesta Fernández, Catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA: que la memoria titulada “**Identificación y caracterización de genes implicados en la floración y el estolonado en fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.)**”, que presenta el licenciado Julio Carlos Muñoz Ávila, ha sido realizado bajo su tutela y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor. Y para que conste a efectos de lo establecido en el artículo 18 del Real Decreto 1393/2007, regulador de las Enseñanzas de Doctorado, **autoriza** la presentación de esta Tesis en la Universidad de Málaga.

Málaga, de Septiembre de 2016

Fdo.: Victoriano Valpuesta Fernández



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El doctorando ha disfrutado de una beca predoctoral del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) cofinanciada por la Junta de Andalucía y fondos FEDER. El trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, el MINECO y fondos FEDER (proyectos AGR-2008-3230 y AGL2012-40066-C02-01).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Seis años, eso es lo que he tardado en poder escribir estas palabras. En terminar esta Tesis doctoral. Incontables horas de esfuerzo, trabajo y reflexión. Muchas horas de frenética actividad (a mi ritmo) y estrés, con plena dedicación. Ahora mismo están muy vivos los sentimientos de frustración acumulados durante la escritura, interminables días delante del ordenador, dando forma a este trabajo. Pero como digo, ha sido tanto tiempo, que he aprendido mucho desde el punto de vista académico y científico. He conocido a personas increíbles desde el primer día. Y lo que es más importante, he aprendido a lidiar con la frustración, ver lo positivo y atesorar los buenos momentos. En definitiva ha sido toda una experiencia y un gran logro, que no hubiera sido posible sin la ayuda, el apoyo y el cariño de todas las personas que me han acompañado en todo este tiempo.

Ante todo quiero agradecer a mis directores de tesis, **Iraida Amaya** y **Pepe Sevilla**, por darme la oportunidad de trabajar en lo que me gusta. Por su ayuda, sus certeros consejos y su comprensión. No siempre hemos estado de acuerdo y nos ha faltado compenetración, pero hemos sido capaces de sobreponernos y trabajar juntos.

Gracias a mis “otros jefes” **Miguel Botella**, **Victoriano Valpuesta** y **Eduardo Bejarano**, por su sabia dirección y sus acertadas correcciones durante los Lab Meeting. Por mostrarme su pasión por nuestra disciplina y abrirme la puerta de sus laboratorios siempre que lo necesite.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio de Genómica y Biotecnología del fruto y en especial a **Toni Granell**, por brindarme la oportunidad de conocer otra manera de trabajar y tratarme como unos más durante mi estancia en el IBMCP de Valencia.

A mis compañeros del Centro IFAPA de Churriana por su ayuda y compañerismo durante todos estos años. Gracias de corazón a **Yasmín**, **Yanet**, **Blanca**, **Meltem**, **José Luis**, **Eli Imbroda**, **Isa Vidoy**, **Clara**, **Adela**, **Josefa**, **Sonia**, **Laura**, **Inma**, **Anabel**, **Jorge**, **Nieves**, **Gema**, **Juan Ramón**, **José Miguel**, **Ignacio**, **Carmen R.**, **Eva**, **Rosalía**, **José M^a** y **Leonardo**. Gracias a **Marta** y **Pepa Gálvez**, por su ayuda con la transformación y el cultivo *in-vitro*. A **Elsa** por su gran ayuda con la estadística y **Mayte**, por su amistad y apoyo. Gracias a **Carmen Soria**, **Isa Padilla** y **Araceli Barceló** por ayudarme siempre que lo necesite y su gran profesionalidad. Gracias a **Amalia** por ayudarme en mis primeros pasos y enseñarme lo que nunca debo hacer, como autoclavar la urea. No puedo olvidarme de todo el personal de administración, limpieza y campo, cuyo oscuro trabajo, mantiene funcionando el centro: **Pepillo**, **Conchi**, **Pepa**, **Baltasar**, **Nani**, **Yolanda**, **Marisol**, **Elena**, **Ana**, **Paloma**, **Carmen V.** y

Nieves. Muchas gracias a **José Manuel López Aranda**, por su dedicación, sabiduría y pasión por la “frutilla”.

Muchas gracias a todos los compañeros del laboratorio de bioquímica y genética de la UMA. Gracias **Araceli, Carmen Beuzón, Javier Ruiz Albert, Juanjo y Natasha, Abel, Ana Luna y Diego, Zaira, Álvaro Piedra, Álvaro García, Pepe, Miguel, Miguelito, Fran, Amalia, Lola, Begoña, Eva y Juanje, Karen, José Rufián, Manolo, Diego, Eloy y Blanca, Ana Casañal, Delphine, Humberto, Vitor Amorim y Teresa, Mario, Yulia, Sophia, Paqui, Carmen y David.** No podía olvidarme de **Sonia y José Vallarino, Verónica e Ian, Alicia y Juan Carlos, Naoufal y Radia**; gracias chicos por vuestra ayuda en el laboratorio, vuestro cariño y amistad. Muchas gracias a **Jessi y Tabata**, por su amistad y todos los grandes momentos compartidos. Muchas gracias a **Edgar**, por su ayuda en el laboratorio, sus consejos durante los meeting. Pero sobre todo por ser un gran amigo.

Mención especial merecen **Luis y Laura**, gracias por ayudarme y a la vez soportarme, por todos los años compartidos, por abrirme las puertas de vuestra casa y por hacerme sentir parte de vuestra familia. Gracias a **Ana Belén, Canena, Diego, Eli Álvarez, Laura y Vero**, por vuestra amistad y ayuda desde que coincidimos en la Rábida. Por todos los momentos compartidos, en muchos lugares...(Huelva York, Lisboa, Sevilla, Canena, Campillos, Granada, Málaga), siempre con una sonrisa y en sintonía. Gracias.

Muchísimas gracias a **Borja, Enrico, Enrique, Javier y Edu.** Me faltan páginas para describir lo que me habéis ayudado, no solo en el trabajo. Gracias por todas las charlas compartidas, por los buenos ratos del desayuno, las comidas, las sobremesas, el pádel, el fútbol y sus derivados...Sin vuestra amistad hubiera sido imposible llegar hasta el final. Muchas gracias a todos los fanegas: **Rob, Colli, Rome, Juanjo, Manolo, Rubén, Lean, Vitor, Chopos, Emilio y Faló.** Con los que llevo compartiendo enormes momentos desde chiquitico. Sois los mejores amigos que se pueden tener.

Muchas gracias a mis Padres, **Rogelia y Manuel.** Por su cariño, comprensión e incondicional apoyo, por quererme tanto, gracias. Os quiero mucho. Muchas gracias **Mariluz y Pablo** por ser tan buenos hermanos, ejemplos a seguir y mejores personas. Gracias a mis tres sobrinas: **María Jesús, María y Paula**, por sus sinceros abrazos y por alegrarme el día con solo verlas. Gracias a **Alberto y Emilia**, por vuestro cariño. Os quiero.

Por último, muchas gracias a mi novia, **ELI.** Gracias por tu enorme ayuda durante estos cinco años. Por tu comprensión, cariño y amor, demostrado cada día. Gracias por no desfallecer, por creer en mí siempre y no dejarme abandonar. Te quiero un chingo Nenita.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice

Abreviaturas	23
Genes	29
Resumen	33
Capítulo 1: Introducción	41
1. Control molecular de la floración	41
1.1 Rutas metabólicas que controlan la floración.....	42
1.1.1 Ruta dependiente del fotoperiodo y calidad de la luz. Papel central de <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i>	42
1.1.2 Floración en respuesta a bajas temperaturas. Vernalización.....	44
1.1.3 Control autónomo de la floración.	45
1.1.4 Efecto de las giberelinas sobre la floración.	46
1.2 Particularidades de las familias génicas más importantes relacionadas con el control de la floración.	47
1.2.1 La familia <i>CONSTANS (CO)</i> de factores de transcripción.	47
1.2.2 El complejo de activación <i>FLOWERING LOCUS D (FD)</i> y <i>FT</i>	48
1.2.3 Factores de transcripción tipo <i>MADS</i> relacionados con la floración.	49
1.2.3.1 El activador floral <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)</i> es un factor de transcripción tipo <i>MADS</i>	50
1.2.3.2 La función de <i>AGAMOUS LIKE 6 (AGL6)</i> en la floración.....	52
2. El género <i>Fragaria</i>	53
2.1 Taxonomía y distribución geográfica.	53
2.2 Características botánicas de la fresa.	54
2.3 Fisiología de la fresa.	56
2.3.1 Comportamiento frente al fotoperiodo.	56
2.3.2 Comportamiento frente a la temperatura ambiente.	57
2.3.3 Ciclo de crecimiento habitual de <i>Fragaria × ananassa</i> en Andalucía. Particularidades del sistema de producción Español.	58
2.3.4 Efecto de las giberelinas en el crecimiento de la fresa.....	59
2.4 <i>Fragaria vesca</i> como especie modelo del género <i>Fragaria</i>	60
2.5 La fresa cultivada <i>Fragaria × ananassa</i>	62
2.5.1 Historia.	62
2.5.2 Importancia económica de la fresa cultivada.....	62
3. Marcadores moleculares	65
3.1 Generalidades.	65
3.2 Tipos de marcadores moleculares.....	67
3.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).	67
3.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).	68
3.2.3 Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	68
3.2.4 Microsatélites o Simple Sequence Repeats (SSR).....	69
3.2.5 Diversity Array Technology (DArT)	70
3.2.6 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	71
3.3 Análisis de grupos segregantes (Bulk Segregant Analysis, BSA).....	72

Capítulo 2: Estudio de genes reguladores de la inducción floral en <i>Fragaria × ananassa</i>.	77
1. Objetivos.	77
2. Material y Métodos.	79
2.1 Material Vegetal.....	79
2.1.1 Material vegetal para aislamiento de los genes.	79
2.1.2 Material vegetal para estudios de expresión génica en tejidos.....	79
2.1.3 Recolección de muestras para el control circadiano de la floración.	82
2.2 Aislamiento de RNA total, tratamiento con DNasa I y síntesis de cDNA.	82
2.3 Clonaje de genes en cultivar ‘Selva’.....	83
2.4 Protocolo de transformación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α mediante choque térmico.	84
2.5 Minipreparación de plásmido mediante lisis alcalina.....	84
2.6 Experimentos de expresión génica.	85
2.7 Transformación estable de fresa (<i>Fragaria × ananassa</i>).	86
2.7.1 Construcción de los vectores de sobre-expresión.	86
2.7.2 Transformación de bacterias por electroporación.	86
2.7.3 Material vegetal.....	86
2.7.4 Transformación de fresa (<i>Fragaria × ananassa</i>).	87
2.7.5 Extracción de ADN genómico de fresa.....	89
2.7.6 Condiciones de aclimatación y crecimiento de las plantas transgénicas en invernadero de confinamiento.....	90
2.8 Análisis bioinformático de las secuencias.	91
2.9 Análisis estadísticos de los datos.	91
3. Resultados.....	93
3.1 Caracterización del gen <i>CONSTANS (CO)</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	93
3.1.1 Identificación del gen <i>FaCO</i> de la fresa cultivada.	93
3.1.2 Análisis de la expresión de <i>FaCO</i> en distintos órganos.....	97
3.1.3 Control de la expresión de <i>FaCO</i> por el ritmo circadiano.	97
3.1.4 Diferencias de expresión de <i>FaCO</i> entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración....	99
3.1.5 Análisis de la sobre-expresión de <i>FaCO</i> en ‘Camarosa’.	101
3.1.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).	101
3.1.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).	105
3.2.5.3 Evaluación en el Tercer año (2016).	107
3.2 Caracterización del gen <i>FLOWERING LOCUS D (FD)</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	108
3.2.1 Identificación de genes con homología a <i>AtFD</i> en fresa.....	108
3.2.2 Análisis de la expresión de <i>FaFD</i> y <i>FaD2</i> en diferentes órganos.....	112
3.2.3 Diferencias de expresión de <i>FaFD2</i> entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.....	113
3.2.4 Análisis de la expresión de <i>FaFD2</i> durante el ciclo día/noche.	114
3.2.5 Análisis de la sobre-expresión de <i>FaFD2</i> en ‘Camarosa’.....	116
3.2.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).	116
3.2.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).	119
3.2.5.3 Evaluación en el Tercer año (2016).	121

3.3 Caracterización de genes de la subfamilia de factores de transcripción MADS tipo <i>MICK^C</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	122
3.3.1. Caracterización de <i>SUPPRESSOR OF THE OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (FaSOC1)</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	124
3.3.1.1 Identificación del ortólogo de <i>SOC1</i> en la fresa cultivada.....	124
3.3.1.2 Diferencias en la expresión de <i>FaSOC1</i> entre distintos órganos.....	127
3.3.1.3 Diferencias de expresión de <i>FaSOC1</i> entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.	127
3.3.1.4 Análisis de la expresión de <i>FaSOC1</i> en relación con el ritmo circadiano.	129
3.3.1.5 Análisis de la sobre-expresión de <i>FaSOC1</i> en ‘Camarosa’.....	130
3.3.1.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).	131
3.3.1.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).	134
3.3.1.5.3 Evaluación en el tercer año (2016).	138
3.3.2 Caracterización de <i>AGAMOUS LIKE 6 (FaAGL6)</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	141
3.3.2.1 Identificación del ortólogo de <i>AtAGL6</i> en la fresa cultivada.	141
3.3.2.2 Análisis de la expresión de <i>FaAGL6</i> en distintos órganos.	145
3.3.2.3 Diferencias de expresión de <i>FaAGL6</i> entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.	145
3.3.2.4 Análisis de la sobre-expresión de <i>FaAGL6</i> en ‘Camarosa’.....	147
3.3.2.4.1 Evaluación en el Primer año (2014).....	147
3.3.2.4.2 Evaluación en el Segundo año (2015).	149
3.3.2.4.3 Evaluación en el Tercer año (2016).	152
4. Discusión.	153
4.1 <i>FaCO</i> es el gen ortólogo a <i>CO</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	154
4.2 Implicaciones del patrón de expresión observado para <i>FaCO</i>	154
4.3 La sobre-expresión de <i>FaCO</i> afectó negativamente al tamaño de la planta y a la capacidad de reproducción asexual de <i>Fragaria × ananassa</i>	158
4.4 <i>FaFD2</i> forma parte de la familia de factores de transcripción bZIP de <i>Fragaria × ananassa</i>	159
4.5 <i>FaFD2</i> y <i>FaFD</i> presentan patrones de expresión muy distintos.	161
4.6 Efectos de la sobre-expresión de <i>FaFD2</i>	163
4.7 Factores de transcripción MADS tipo <i>MICK^C</i> en <i>Fragaria vesca</i> y su papel en el desarrollo vegetativo y la floración.	164
4.8 <i>FaSOC1</i> es el gen ortólogo a <i>SOC1</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	165
4.9 Implicaciones del patrón de expresión observado en <i>FaSOC1</i>	165
4.10 La sobre-expresión de <i>FaSOC1</i> retrasa la floración e induce el crecimiento vegetativo en <i>Fragaria × ananassa</i>	167
4.11 La sobre-expresión de <i>FaSOC1</i> altera la morfología floral y dificulta la correcta maduración del receptáculo y los aquenios.	168
4.12 Modelo de regulación de <i>FaSOC1</i> en la floración y el estolonado de fresa.....	170
4.13 <i>FaAGL6</i> es el gen ortólogo a <i>AGL6</i> en <i>Fragaria × ananassa</i>	170
4.14 <i>FaAGL6</i> se expresa mayoritariamente en la flor cerrada de <i>Fragaria × ananassa</i>	171
4.15 La sobre-expresión de <i>FaAGL6</i> no adelantó la floración en <i>Fragaria × ananassa</i>	173

Capítulo 3: Identificación de marcadores moleculares ligados al estolonado en <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>.	179
1. Objetivos	179
2 Material y Métodos.	181
2.1. Población de muestreo ‘Endurance’ × ‘Parker’	181
2.2 Extracción de ADN	181
2.3 Marcadores AFLPs	182
2.4 Amplificación de marcadores microsatélites (SSRs)	184
2.5 Separación y visualización de los marcadores AFLPs y microsatélites	185
2.6 Programa de cartografiado	185
2.7 Marcadores DArTseq	185
2.8 Análisis de la expresión mediante RNA-seq	186
2.9 Filtrado de datos y cruzado de marcadores polimórficos con RNA-seq	188
3. Resultados	189
3.1 Análisis de la segregación del estolonado e identificación de marcadores AFLPs ligados a este carácter en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’	189
3.2 Análisis genético del estolonado en ‘Endurance’ y ‘Parker’	190
3.3 Genotipado de la población segregante ‘Endurance’ × ‘Parker’ con los marcadores AFLPs polimórficos	191
3.4 Mapa de ligamiento del <i>locus R</i>	192
3.5 Análisis de grupos segregantes (BSA) usando marcadores Microsatélites (SSR)	194
3.6 Identificación de genes diferencialmente expresados mediante RNA-seq	196
3.7 Análisis de marcadores SNP DArTseq ligados al carácter del estolonado	204
4. Discusión	207
4.1 La población ‘Endurance’ × ‘Parker’ es segregante para el estolonado	208
4.2 El cultivar ‘Endurance’ es responsable de la segregación del estolonado en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’	210
4.3 Las giberelinas y el etileno juegan un papel importante en el control del estolonado en <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	212
Capítulo 4: Conclusiones	219
Bibliografía	223
Apéndice	253
1. Número de acceso de las secuencias utilizadas	253
2. Análisis estadístico de los datos de expresión génica entre variedades	258
3. Mediciones del estolonado y conformación de los grupos usados para los distintos experimentos	264
4. Listado cebadores usados en el mapeo del <i>locus R</i>	267
5. Factores de transcripción presentes en la experiencia de RNA-seq	272
6. Marcadores DArTs cruzados con la experiencia de RNA-seq	274
7. Datos de expresión de los genes con tasas de cambio superiores a 2 en la experiencia de RNA-seq	276



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μF	Micro faradio
μL	Micro litros
A	Adenina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisms
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair (pares de bases)
bsa	Albúmina de suero bovino
BSA	Bulk Segregant Analysis
bZip	Basic leucine zipper
C	Citosina
CCT	Motivo CONSTANS , CONSTANS-like y TIMING OF CAB EXPRESSION 1
cDNA	Molécula de ADN complementario
cM	CentiMorgan (unidad de mapa)
cm	Centímetros
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
cv	Cultivar
DArT	Diversity arrays technology
Dil	Dilución
DN	Día neutro
DNasa	Enzima endonucleasa que genera rupturas no específicas en el ADN
dNTPs	Mezcla de desoxirribonucleotidos trifosfatados (ATP,CTP, GTP Y TTP)
DTT	Ditrioteitol
Duch.	Duchesne
EB	Variedad de fresa de Día neutro o <i>everbering</i> .
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ER	Enzima de restricción
EST	Expressed Sequence Tag
<i>et al.</i>	<i>et aleri</i>
F ₁	Primera generación tras cruzamiento de parentales.
F ₂	Segunda generación tras la auto-fecundación de la F ₁
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations
FMI	Grupo de genes que controlan la identidad del SAM
FPI	Genes que actúan como integradores florales
FPKM	Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads
g	Gramos
G	Guanina
GA(s)	Giberelina(s)
GBS	Genotyping by sequencing
HG	Grupo de homeología
ID	Número de identificación

KDa	Kilodalton
KV	Kilovoltios
LB	Medio Luria y Broth
LD	Día largo. "Long day".
LG	Grupo de ligamiento
LOD	Log ₁₀ of the odds ratio
M	Molar
MAS	Mejora asistida por marcadores
MiliQ	Agua ultrapura, obtenida por Sistema de purificación de agua tipo I
min	Minutos
miR	Micro ARN
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
NGS	Next generation DNA sequencing methods
OD	Densidad óptica
OPA	Buffer "one for all"
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. "Polymerase Chain Reaction"
PVPP	Polivinil polipirrolidona
QTLs	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIN	RNA integrity number
RNAi	Técnica del ARN interferente
RNasa	Enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN
RNA-seq	Secuenciación masiva de ARN
rpm	Revoluciones por minuto
SAM	Meristemo apical
SD	Día corto. "Short day"
Sec	Secuenciación
seg	Segundos
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssp	Especies
SSRs	Simple Sequence Repeats
T	Toneladas
T	Timina
TA	Temperatura de anillamiento (<i>annealing</i>)
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
TF	Factor de transcripción
TGS	Third generation DNA sequencing methods
u	Unidades de enzima
USA	Estados Unidos de América
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
Ω	Ohmios
SDS	Dodecilsulfato sódico
2-BE	2-butoxi-etanol

ATG	Codón de inicio
CaMv35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
MCS	Multiple cloning site
MS	Medio de cultivo Murasige y Skoog
IBA	Análogo comercial de Auxina
BA	Análogo comercial de citoquinina
PvPP	Polivinil polipirrolidona
PF	Variedad de fresa con floración perpetua
ABA	Acido abscisico
IAA	Acido indol acético (auxina)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Genes



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Genes

<i>AG</i>	<i>AGAMOUS</i>
<i>AGL</i>	<i>AGAMOUS LIKE</i>
<i>AP1</i>	<i>APETALA1</i>
<i>ATC</i>	<i>ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOG</i>
<i>BFT</i>	<i>BROTHER OF FT and TFL1</i>
<i>CDF</i>	<i>CYCLING DOF FACTOR</i>
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
<i>COL</i>	<i>CONSTANS-LIKE</i>
<i>COP1</i>	<i>CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1</i>
<i>CRY</i>	<i>CRYPTOCHROME</i>
<i>DEF</i>	<i>DEFICIENS</i>
<i>FD</i>	<i>FLOWERING LOCUS D</i>
<i>FKF1</i>	<i>FLAVIN KELCH F-BOX1</i>
<i>FLC</i>	<i>FLOWERING LOCUS C</i>
<i>FLD</i>	<i>FLOWERING LOCUS D</i>
<i>FLK</i>	<i>FLOWERING LOCUS K</i>
<i>FRI</i>	<i>FRIGIDA</i>
<i>FT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>FUL</i>	<i>FRUITFULL</i>
GA20ox	Dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato 20
GA2ox	Dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato 2
GA3ox	Dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato 3
<i>GI</i>	<i>GIGANTEA</i>
<i>GID1</i>	<i>GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1</i>
<i>Hd1</i>	Ortólogo a <i>CO</i> en arroz
<i>Hd3a</i>	Ortólogo a <i>FT</i> en arroz
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
<i>MFT</i>	<i>MOTHER OF FT and TFL1</i>
PCR2	Policomb represive complex2
PEBPs	Phosphatidylethanolamine binding proteins
<i>PHYA</i>	<i>PHYTOCHROME A</i>
<i>R</i>	<i>RUNNERING LOCUS</i>
<i>SEP</i>	<i>SEPALLATA</i>
<i>SFL</i>	<i>SEASONAL FLOWERING LOCUS</i>
<i>SHP</i>	<i>SHATTERPROF</i>
<i>SOC1</i>	<i>SUPRESSOR OF OVERESPRESSION OF CONSTANS1</i>
<i>SPA</i>	<i>SUPRESSOR OF PHYA-105</i>
<i>SPL</i>	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE</i>
SRF	Serum responsive factor
<i>STK</i>	<i>SEEDSTICK</i>
<i>SVP</i>	<i>SHORT VEGETATIVE PHASE</i>
<i>TFL1</i>	<i>TERMINAL FLOWER1</i>
<i>TSF</i>	<i>TWIN SISTER OF FT</i>
<i>VIL1</i>	<i>VERNALIZATION INSENSITIVE3 LIKE1</i>
<i>VIN3</i>	<i>VERNALIZATION INSENSITIVE3</i>
<i>VRN5</i>	<i>VERNALIZATION 5</i>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen

A lo largo de su desarrollo las plantas sufren sucesivas transiciones en respuesta a factores ambientales y endógenos (Albani y Coupland, 2010). La primera transición es el paso del estado juvenil al estado adulto, donde se adquiere la competencia para responder a los inductores florales, consiguiendo florecer y reproducirse. Esta transición es un momento crítico en la vida de las plantas, siendo imprescindible que la planta tenga la madurez suficiente para producir y mantener los órganos reproductores. Durante la transición a la fase reproductora el SAM cambia (Albani y Coupland, 2010). En las plantas anuales, este cambio es irreversible, mientras que la mayoría de las especies perennes, como la fresa, utilizan diferentes estrategias para tener sucesivos eventos de crecimiento vegetativo y reproductor a lo largo de su vida (Battey y Tooke, 2002; Grillo *et al.*, 2009).

La floración es clave para el éxito reproductivo de las plantas y juega un papel determinante en su adaptación y distribución geográfica. Además, debe producirse en un momento favorable de luz y temperatura, que permita el correcto desarrollo de flores y frutos; a la vez que la dispersión de las semillas (Albani y Coupland, 2010). Por ello es uno de los cambios del desarrollo mejor regulado y extensamente estudiado en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con cientos de genes implicados (Kardailsky *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Turk *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Fornara y Coupland, 2009; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009; Andrés y Coupland, 2012; Blümel *et al.*, 2015). Cada señal, ya sea endógena o exógena, afecta de una manera distinta a la floración, pero en última instancia, todas las rutas convergen, alterando la expresión de un reducido grupo de genes llamados integradores florales (FPIs): *FLOWERING LOCUS T (FT)*; Kardailsky *et al.*, 1999), *TWIN SISTER OF FT (TSF)*; Yamaguchi *et al.*, 2005), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*; Yoo *et al.*, 2005) y *AGAMOUS-LIKE24 (AGL24)*; Lee *et al.*, 2008). Estos FPIs integran todas las señales y estímulos que recibe la planta, activando o inhibiendo (según el caso) la expresión de los genes que controlan la identidad del meristemo, llamados FMI: *LEAFY (LFY)*; Lee *et al.*, 2008), *FRUITFULL (FUL)*; Melser *et al.*, 2008) y *APETALA1 (AP1)*; Abe *et al.*, 2005, Wigge *et al.*, 2005). En *A. thaliana*, se han descrito diversas rutas metabólicas que intervienen en la floración: ruta dependiente del fotoperiodo y calidad de la luz (Turk *et al.*, 2008; Andrés y Coupland, 2012), vernalización (Kim *et al.*, 2009; Andrés y Coupland, 2012), vía autónoma (Fornara y Coupland, 2009) y la ruta dependiente de giberelinas (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

La fresa (*F. × ananassa*), es uno de los cultivos frutícolas con mayor importancia económica en el mundo. España se encuentra situado en el quinto puesto mundial en producción de fresas y es el primer exportador mundial. El 90% de la producción fresera

española se concentra en la provincia de Huelva (Núñez, 2008). Lo que hace a Huelva tan competitiva es su temprana entrada en producción, que permite a las cooperativas y productores copar los mercados centroeuropeos, antes que los productores locales, con fruta a precios elevados y con alta rentabilidad. Por esta razón, el adelanto de la producción, así como la posibilidad de extenderla a verano y otoño, es uno de los objetivos principales para los productores y la industria fresera. Tradicionalmente en Huelva, la precocidad se conseguía gracias a cultivares de día corto (SD) y a la utilización de una industria auxiliar, los viveros de altura, que permitían asegurar la entrada en producción en la segunda quincena de Diciembre (López-Aranda, 2008). Pero con estas prácticas agronómicas se ha tocado techo y los mejoradores son incapaces de adelantar más la producción. Por ello, en la actualidad existe un especial interés en la mejora y utilización de variedades de fresa de floración perpetua (EB o PF) que permitirían extender el periodo productivo a la vez que trasladar parte de la producción a fechas donde tradicionalmente la producción fresera es muy baja. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la floración en fresa están poco estudiados. En relación con esto último, planteamos uno de los objetivos de este trabajo: “Determinar el papel que juegan cinco genes seleccionados (*FaCO*, *FaFD*, *FaFD2*, *FaSOC1* y *FaAGL6*) en la inducción y regulación de la floración en la fresa cultivada (*Fragaria × ananassa*). Para llevar a cabo este objetivo se usaron diversas metodologías y se confeccionaron múltiples experimentos. Lo primero que se realizó fue la identificación y caracterización de los ortólogos en la fresa para estos cinco genes y la posterior determinación de los niveles de expresión de cada uno de ellos en los distintos órganos de la planta. También se evaluó la expresión de cada gen tanto en SD como LD en cuatro cultivares que difieren en su tipo de floración, en aquellos órganos más relevantes para la floración (principalmente hoja y corona). Por último se evaluó el efecto de la sobre-expresión de *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD2* y *FaAGL6* sobre la inducción floral, en particular, y la morfología de la planta, en general, mediante la obtención de plantas transgénicas (*F. × ananassa* cv. Camarosa) que expresan los distintos genes bajo el control del promotor constitutivo 35S.

La expresión *FaCO* se encuentra regulada claramente por el ritmo circadiano, con una oscilación diurna cuyo pico de expresión se produce al final del periodo de oscuridad (amanecer), similar a la presentada por su ortólogo en la fresa silvestre *FvCO* (Rantanen *et al.*, 2014), y otros homólogos como *GmCOL1a* y *b*, *VvCO* y *StCOL1*, en soja, vid y patata, respectivamente (Almada *et al.*, 2009; González-Schain *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014; Abelenda *et al.*, 2016). Este patrón contrasta con el descrito en *A. thaliana* para *AtCO*, donde el pico de expresión se produce durante la tarde en LD (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004). La sobre-expresión de *FaCO* afecta negativamente al crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de la fresa cultivada mientras que no se ha observado una influencia clara de este gen sobre el control fotoperiódico de la floración.

Hemos identificado dos genes con similitud a *FLOWERING LOCUS D* pertenecientes a la familia bZIP, nombrados como *FaFD* y *FaFD2*. Los patrones de expresión de ambos genes son diferentes. La expresión de *FaFD* se localiza específicamente en corona, mientras que la expresión de *FaFD2* es alta en hoja, corona y raíz. La sobre-expresión de *FaFD2* adelanta la floración, por lo que este gen puede representar una herramienta útil para generar fresas más precoces, aunque la sobre-expresión no extendió la floración en condiciones no inductoras (LD).

Hemos caracterizado el gen *FaSOC1* de *F. × ananassa* y demostrado una función equivalente a su ortólogo *FvSOC1* de *F. vesca* (Mouhu *et al.*, 2013). La expresión de *FaSOC1* es mayor en condiciones no inductoras de floración (LD) en todos los cultivares analizados, tanto en hoja, raíz como en corona. La sobre-expresión constitutiva de *FaSOC1* retrasa la floración, promueve el estolonado y la elongación de peciolo e inflorescencias, afecta a la morfología floral y dificulta la correcta maduración de los frutos. La función de *SOC1* en la regulación de la floración en *Fragaria* es por tanto antagónica a la mostrada por el ortólogo en *A. thaliana* (Yoo *et al.*, 2005; Lee y Lee, 2010; Immink *et al.*, 2012).

La expresión del gen *FaAGL6* en *F. × ananassa* se limita a la flor y al fruto verde. Lo que sugiere un papel homeótico de este gen en el desarrollo floral. La sobre-expresión constitutiva de este gen no afectó la floración en el cultivar ‘Camarosa’.

Por otra parte la fresa cultivada posee la capacidad de reproducirse asexualmente a partir de estolones. La reproducción por estolonado permite la multiplicación vegetativa y la conservación de las características varietales propias de cada cultivar. Por ello es de enorme utilidad para la industria viverística, encargada de multiplicar y suministrar las plantas a los productores (Simpson y Sharp, 1988). Esto unido a la creciente importancia adquirida por las variedades de floración perpetua, que presentan una capacidad menor para estolonar (Heide y Sønsteby, 2007), hace al estolonado un carácter muy importante en los programas de mejora actuales.

En la fresa diploide *F. vesca*, el estolonado es controlado por un *locus* dominante denominado *RUNNERING (R)*. La existencia del *locus R* y su posición en el LG II ha sido comprobada en diversos trabajos (Sargent *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Iwata *et al.*, 2012). En los cultivares de floración estacional, la floración y el estolonado son antagónicos, los días largos y las altas temperaturas promueven el crecimiento vegetativo y la formación de estolones, mientras que condiciones de SD favorecen la formación de coronas secundarias y la floración (e inhiben el estolonado) (Heide 1977; Battey *et al.*, 1998; Konsin *et al.*, 2001; Hytönen *et al.*, 2004; Heide y Sønsteby, 2007; Hytönen *et al.*, 2009; Hytönen y Elomaa, 2011). Sin embargo, en los cultivares reflorecientes o de floración perpetua, ambos procesos se solapan en el tiempo y compiten por los mismos meristemas (Battey *et al.*,

1998). En la fresa diploide, el alelo dominante del gen *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)* que controla la floración estacional se hereda independientemente del alelo dominante en el *locus R* (Albani *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2004). Es decir, ambos caracteres están controlados por genes no ligados. Sin embargo, estudios recientes en la especie cultivada, *F. × ananassa*, han mostrado un control genético de ambos caracteres diferente (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015, Perrote *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que el control de estos caracteres es poligénico, controlado por un gen mayor y modulada su función por varios genes más. Estos genes aún no han sido identificados ni caracterizados, por lo que se necesitan más estudios para profundizar en el control genético y el mecanismo molecular detrás del estolonado en la fresa cultivada, segundo de los objetivos de esta tesis. Para la consecución de este importante objetivo analizamos la segregación del carácter del estolonado en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’ segregante para dicho carácter, así como en autofecundaciones de los parentales de dicha población; a la vez que identificábamos marcadores moleculares (AFLPs, SSR y SNP) ligados al estolonado. Para completar el estudio mediante marcadores moleculares se procedió a la identificación de genes diferencialmente expresados entre líneas F₂ de la población estolonantes y no estolonantes, mediante la cuantificación del transcriptoma de la corona usando RNA-seq.

Gracias a las estrategias seguidas hemos identificado un marcador AFLP ligado al carácter del estolonado, aunque ello no nos ha permitido localizar el grupo de ligamiento en el que se encuentran el *locus* responsable. El defecto en el estolonado observado en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’ procede del cultivar ‘Endurance’ el cual, al ser capaz de estolonar normalmente pero transmitir el defecto³⁹ a aproximadamente un 25% de su descendencia F₂, debe presentar un genotipo heterocigoto (*Rr*). El análisis de expresión diferencial por RNA-seq, sobre los grupos contrastantes para el carácter del estolonado, ha mostrado una mayor expresión de genes relacionados con la biosíntesis y el metabolismo del etileno y las giberelinas en las plantas estolonantes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 1:

Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 1: Introducción.

1. Control molecular de la floración.

Tras la embriogénesis y a lo largo de todo su desarrollo, las plantas sufren sucesivas transiciones como respuesta a factores ambientales y endógenos (Albani y Coupland, 2010). La primera transición reconocible es el paso del estado juvenil al estado adulto. Durante la fase juvenil las plantas tienen un crecimiento vegetativo limitado, una capacidad fotosintética baja, son insensibles a los cambios en la duración del día (fotoperiodo) o a la vernalización y por tanto incapaces de florecer y reproducirse. La duración del periodo juvenil es muy variable desde unos pocos días a más de veinte años, dependiendo de la especie (Thomas y Vince-Prue, 1996). Con la adquisición de la edad adulta, las plantas aumentan su crecimiento vegetativo, tienen una mayor capacidad para asimilar nutrientes, adquieren competencia para responder frente a los inductores florales, consiguiendo florecer y reproducirse. En un momento determinado de su vida la planta sufre una transición (determinado por el genotipo y las condiciones ambientales) iniciándose la fase reproductora. Esta transición es un momento crítico en la vida de las plantas. Para conseguir reproducirse con éxito, es imprescindible, por una parte, que la floración se produzca en sincronía con otros miembros de su misma especie y, por otra parte, que la planta haya alcanzado cierto nivel energético y de madurez que le permita soportar el gasto extra de crear y mantener los órganos reproductores. Además la floración debe producirse en el momento del año más favorable, cuando las condiciones de luz y temperatura permitan el desarrollo y maduración de los frutos y por tanto una correcta dispersión de las semillas para la perpetuación de la especie (Albani y Coupland, 2010).

A lo largo de estas fases, el meristemo apical (SAM) formará diferentes órganos a partir de los meristemas laterales. Durante el crecimiento vegetativo el SAM produce meristemas que darán lugar a órganos vegetativos como hojas o ramas. Durante la transición a la fase reproductora el SAM cambia, convirtiéndose en un meristemo reproductivo que dará lugar a flores o inflorescencias (Albani y Coupland, 2010). En las plantas anuales, este cambio es irreversible, mientras que la mayoría de las especies perennes utilizan diferentes estrategias para tener sucesivos eventos de crecimiento vegetativo y reproductor a lo largo de su vida. El número de eventos reproductivos depende de la estrategia que ésta siga. La estrategia monocárpica se caracteriza por un único evento reproductor seguido de un proceso de senescencia y muerte, y es seguida por todas las plantas anuales y algunas perennes como el bambú y el agave (Battey y Tooke, 2002). Por el contrario, en la estrategia policárpica, las plantas florecen sucesivas

veces a lo largo de toda su vida, y es seguida por la mayoría de las plantas perennes (Grillo *et al.*, 2009). Las plantas policárpicas, tienen la capacidad de retomar el crecimiento vegetativo tras un evento reproductor, ya sea conservando algunos meristemos en estado vegetativo (Foster *et al.*, 2003) o bien revirtiendo los meristemos reproductivos al estado vegetativo después de la floración (Tooke *et al.*, 2005).

La floración es clave para el éxito reproductivo de las plantas y juega un papel determinante en su adaptación y distribución geográfica. Por ello es uno de los cambios en el desarrollo más y mejor regulado de la vida de éstas. La genética y el control molecular de este proceso ha sido extensamente estudiado en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con la identificación de cientos de genes implicados. Todos estos estudios han puesto de manifiesto que tanto señales internas como externas regulan la floración (Kardailsky *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Turk *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Fornara y Coupland, 2009; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009; Andrés y Coupland, 2012; Blümel *et al.*, 2015). Cada señal, ya sea endógena o exógena, afecta de una manera distinta a la floración. Cada una consta de una ruta metabólica propia. Pero en última instancia, todas las rutas convergen, alterando la expresión de un reducido grupo de genes llamados integradores florales (FPIs): *FLOWERING LOCUS T (FT)*; Kardailsky *et al.*, 1999), *TWIN SISTER OF FT (TSF)*; Yamaguchi *et al.*, 2005), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*; Yoo *et al.*, 2005) y *AGAMOUS-LIKE24 (AGL24)*; Lee *et al.*, 2008). Estos FPIs integran todas las señales y estímulos que recibe la planta, activando o inhibiendo (según el caso) la expresión de los genes que controlan la identidad del meristemo (llamados FMIIs): *LEAFY (LFY)*; Lee *et al.*, 2008), *FRUITFULL (FUL)*; Melser *et al.*, 2008) y *APETALA1 (AP1)*; Abe *et al.*, 2005, Wigge *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, se han descrito diversas rutas metabólicas que intervienen en la floración: ruta dependiente del fotoperiodo y calidad de la luz (Turk *et al.*, 2008; Andrés y Coupland, 2012), vernalización (Kim *et al.*, 2009; Andrés y Coupland, 2012), vía autónoma (Fornara y Coupland, 2009) y la ruta dependiente de giberelinas (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

1.1 Rutas metabólicas que controlan la floración.

1.1.1 Ruta dependiente del fotoperiodo y calidad de la luz. Papel central de *FLOWERING LOCUS T (FT)*.

La duración del día es diferente en las distintas estaciones del año, variando de una manera predecible. Las plantas pueden ser divididas en tres grandes grupos según como respondan a estos cambios: plantas de día largo (LD) que florecen cuando los días se alargan (normalmente en verano), plantas de día corto (SD) que florecen cuando los

días se acortan (normalmente en otoño) y plantas de día neutro (DN) que florecen independientemente de la duración de día (Garner y Allard, 1920). *Arabidopsis* florece más rápidamente en condiciones de LD que en SD (Gregory y Hussey, 1953). La regulación del promotor floral *CONSTANS* (*CO*) es clave en la percepción del LD por las hojas y por tanto en la inducción de la floración bajo estas condiciones (Turk *et al.*, 2008; Andrés y Coupland, 2012). La transcripción de *CO* es reprimida por la familia de factores de transcripción CYCLING DOF FACTORS por la mañana (CDF1-5; Imaizumi *et al.*, 2005; Sawa *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2015). Durante el día CDFs son degradados por GIGANTEA (GI) y FLAVIN KELCH F-BOX (FKF1), que forman un complejo proteico activado por la luz azul, que a su vez activan la transcripción de *CO* (Imaizumi *et al.*, 2005; Sawa *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2015). Para que el complejo GI-FKF1 se forme es necesario que la expresión de *GI* y *FKF1* coincida, y esto solo ocurre durante la tarde en condiciones de LD, pero no en SD; de tal forma que en LD se produce un pico de expresión de *CO* al final del periodo de luz, mientras que en condiciones de SD este pico se produce después del anochecer (Suarez-López *et al.*, 2001). La proteína *CO* es degradada rápidamente por el proteosoma en condiciones de oscuridad, gracias a la interacción de CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) y SUPRESOR OF PHYA-105 (SPA) (Valverde *et al.*, 2004); mientras que es estabilizada por la luz azul vía CRYPTOCHROME 1 y 2 (CRY1 y 2) y las radicales en el rojo lejano a través de PHYTOCHROME A (PHYA), (Valverde *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008), (**Figura 1**).

La función principal de la proteína *CO* es inducir la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Putterill *et al.*, 1995), interactuando directamente con el promotor de *FT* en las células acompañantes del floema de la hoja (Tiwari *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, la proteína *FT* es un potente inductor de la floración que se mueve desde las hojas hasta el SAM (Corbesier *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007). En el meristemo, *FT* forma un complejo con el factor de transcripción bZIP *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005) e inicia la floración al activar la expresión de FPIs como *SOC1* (Michaels *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005) y FMIIs (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Melser *et al.*, 2008). El mecanismo por el que *FT* se acumula en las hojas y desde allí se mueve hasta el SAM para inducir la floración, es consistente con el concepto que surgió en estudios antiguos de “florigen” (Chailakhyan, 1936), una señal inductora de la floración que se produce en hojas bajo condiciones específicas y que actúa de manera sistémica por translocación al meristemo apical tanto en plantas LD como SD (Andrés y Coupland, 2012; Taoka *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

El gen *FT* presenta cierta homología con la familia de proteínas PEBPs (phosphatidylethanolamine binding proteins), muy presentes en bacterias, animales y plantas, donde intervienen en multitud de rutas metabólicas relacionadas con el

crecimiento y la diferenciación celular (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* la familia PEBP está formada por seis proteínas: FLOWERING LOCUS T (FT), TERMINAL FLOWER1 (TFL1), TWIN SISTER OF FT (TSF) BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT), ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOG (ATC) y MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT) (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2004; Wickland y Hanzawa, 2015). En *Arabidopsis* [y muchas otras angiospermas (Turk *et al.*, 2008; Wickland y Hanzawa, 2015)] FT y TFL1 se encargan de regular la floración (transición entre fase juvenil y adulta) y la arquitectura floral de forma antagónica. Mientras FT promueve el cambio, estimulando la diferenciación del meristemo apical y la floración, TFL1 lo reprime, inhibiendo la expresión de *LFY*, *AP1* y *FUL*; a la vez que compite con FT al interactuar y unirse a FD (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Hanano y Goto; 2011; Wickland y Hanzawa, 2015). El resto de proteínas de la familia, poseen funciones parecidas a FT/TFL1. TSF y MFT se comportan igual que FT (Yoo *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2009). ATC es capaz de moverse por el floema como FT, hasta el SAM, pero allí reprime la floración (Huang *et al.*, 2012) y BFT posee el mismo comportamiento que TFL1 (Yoo *et al.*, 2010).

1.1.2 Floración en respuesta a bajas temperaturas. Vernalización.

La floración estacional también puede estar regulada por la exposición a bajas temperaturas, respuesta llamada vernalización y cuya función es prevenir la floración de plantas de latitudes altas antes o durante el invierno y así asegurar una reproducción exitosa cuando las temperaturas sean más adecuadas (Kim *et al.*, 2009). En este caso son necesarias varias semanas de frío para la total inducción de la floración por vernalización. Las plantas que necesitan de vernalización para florecer producen represores que bloquean la floración hasta que se alcanzan los requerimientos de frío. Una vez alcanzadas las horas de frío necesarias, la expresión de estos represores florales disminuye, permitiendo la floración en la primavera. El estudio de accesiones de *Arabidopsis* que difieren en sus necesidades de vernalización (las '*winter annuals*', necesitan frío; las '*summer annuals*', no necesitan frío) ha permitido identificar importantes componentes de esta ruta metabólica. Concretamente las accesiones *winter annuals* poseen alelos activos en dos loci, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *FRIGIDA (FRI)* mientras que las accesiones *summer annuals* poseen alelos mutados de uno o ambos genes (Michaels y Amasino, 1999; Shindo *et al.*, 2005). El gen *FRI* codifica para una proteína sin homología a proteínas conocidas pero con dos dominios potenciales 'coiled-coil' de unión a otras proteínas o a ácidos nucleicos (Shindo *et al.*, 2005; Geraldo *et al.*, 2009). La proteína FRI activa la expresión de *FLC*. *FLC* es un factor de transcripción tipo MADS que bloquea la expresión de *SOC1*, *FT* y *FD*, actuando como represor floral (Michaels y Amasino, 1999; Searle *et al.*, 2006). Los niveles de mensajero de *FLC* disminuyen progresivamente, tras varias semanas

de exposición al frío, de esta forma la planta se asegura de no florecer tras pocos días de frío en otoño (Gendall *et al.*, 2001).

Durante las semanas de frío necesarias para la vernalización, se induce la expresión del gen *VERNALIZATION INSENSITIVE3* (*VIN3*) que codifica para una proteína específica de plantas encargada de la represión de *FLC* (Sung y Amasino, 2004). Junto con *VIN3* es necesario la acción de otras proteínas de la misma familia génica, *VERNALIZATION 5* (*VRN5*) y *VERNALIZATION INSENSITIVE3 like-1* (*VIL1*), para la completa represión de *FLC* (Sung *et al.*, 2006; Greb *et al.*, 2007). Tanto *VIN3*, *VRN5* y *VIL1* pertenecen a un complejo proteico represivo similar al Polycomb Repressive Complex2 (PRC2) descrito en eucariotas (Wood *et al.*, 2006). Todos estos genes actúan a nivel de la cromatina, silenciando *FLC* mediante metilaciones de la lisina 9 o 27 de la histona 3 (H3K9 o H3K27; Sung y Amasino, 2004, Kim *et al.*, 2009), (Figura 1).

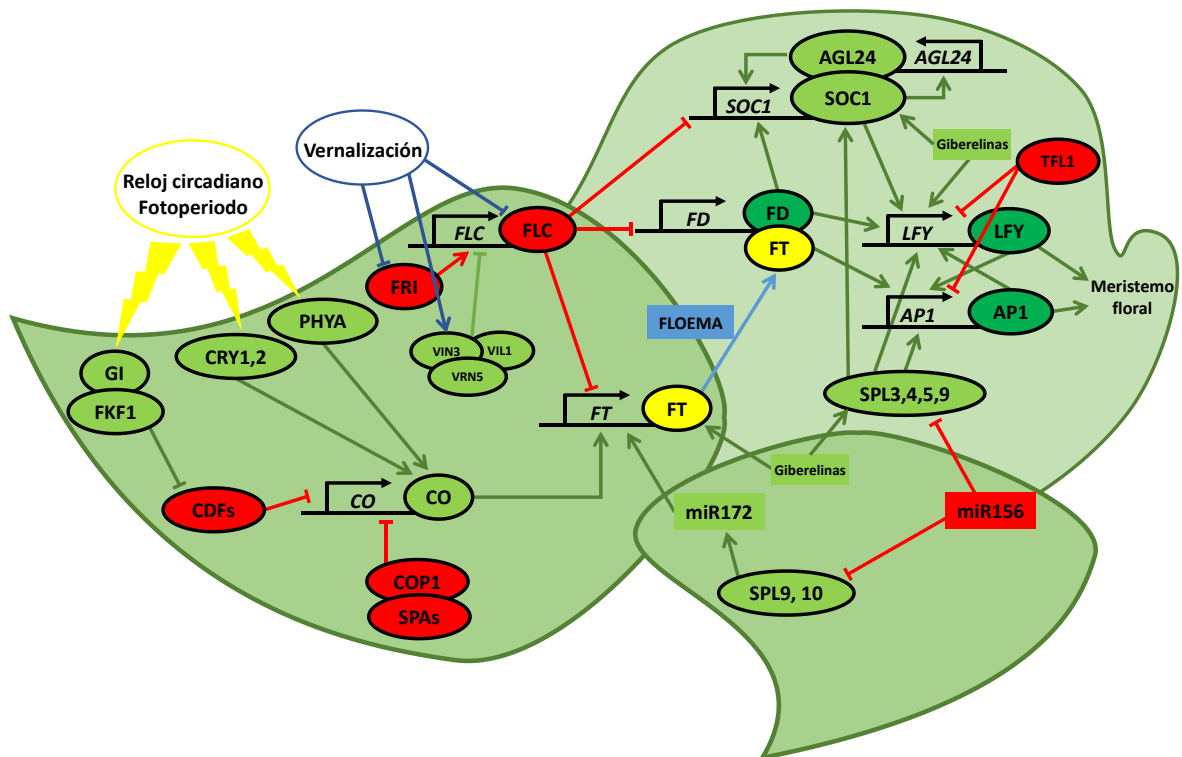


Figura 1. Visión general de la regulación de la floración en *Arabidopsis* en hoja (verde oscuro) y meristemo apical (SAM, verde claro). Las proteínas implicadas están representadas por círculos, los promotores se representan en cursiva y debajo de flechas negras. Las flechas representan activación y las líneas con barras perpendiculares representan represión. En general, los componentes de la regulación que promueven la floración se representan en verde o amarillo y los que la reprimen son representados en rojo. Adaptado de Amasino, 2010.

1.1.3 Control autónomo de la floración.

El término “autónomo” se usa en floración para referirse a mecanismos o rutas metabólicas independientes o no reguladas por ninguna señal ambiental. En muchas especies, por ejemplo, la floración no puede ocurrir antes de la transición de la fase juvenil

a la adulta. Esta transición es un ejemplo de ruta autónoma que resulta en la competencia para florecer (Amasino, 2010). La ruta autónoma responde a señales endógenas para promover la floración reduciendo los niveles basales de transcripción de *FLC*. Se estudió en *Arabidopsis* mediante la caracterización de mutantes de floración tardía en accesiones que no requieren vernalización (*summer annuals*). Estos mutantes en la ruta autónoma se caracterizan por un retraso en la floración tanto en SD como en LD, a diferencia de los mutantes afectados en el control por el fotoperiodo que muestran retraso en la floración solo en LD. La vía autónoma no parece ser una ruta metabólica lineal, sino que está formada por un variado grupo de genes que: (i) en general están involucrados en la represión de la expresión génica, (ii) o bien participan en el establecimiento de la expresión basal de *FLC* y (iii) normalmente se tratan de genes implicados no solo en el control de la floración, sino en multitud de procesos relacionados con el desarrollo. Algunos de estos genes incluyen por ejemplo factores de transcripción como *TFL1* (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999) y proteínas implicadas en el procesamiento de RNA como: FLOWERING LOCUS D (FLD), FCA, FVE, FPA, FLK (FLOWERING LOCUS K), FY, LD (LUMINIDEPENDENS) y REF6 (Blázquez *et al.*, 2003; He, 2009; Kim *et al.*, 2009; Michaels, 2009). Por ejemplo, FVE reduce los niveles de SVP en el meristemo apical, promoviendo la floración, de una forma indirecta (Li *et al.*, 2008).

Recientes estudios han puesto de manifiesto también la implicación de varios microRNA (miR156, miR172) en el control de la transición juvenil-adulto y relacionados con la regulación de la expresión de promotores florales como *FT* (Aukerman y Sakai, 2003), *SOC1*, *LFY* y *AP1* (Yamaguchi *et al.*, 2009), (**Figura 1**).

1.1.4 Efecto de las giberelinas sobre la floración.

Las giberelinas inducen la floración de *Arabidopsis* tanto en LD como SD (Wilson *et al.*, 1992; Moon *et al.*, 2003; Porri *et al.*, 2012). Se ha demostrado el importante papel que ejercen las giberelinas en la inducción en hoja de *FT* y *TSF*; *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE* (*SPL3*, 4, 5 y 9) y *LEAFY* (*LFY*) en el meristemo durante la inducción floral en respuesta a LD (Blázquez *et al.*, 1998; Porri *et al.*, 2012), (**Figura 1**). Además, las giberelinas reducen la expresión del factor de transcripción tipo MADS, *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), que reprime la floración al inhibir directamente la expresión de *SOC1* (Li *et al.*, 2008).

1.2 Particularidades de las familias génicas más importantes relacionadas con el control de la floración.

1.2.1 La familia *CONSTANS (CO)* de factores de transcripción.

Los genes *CONSTANS LIKE (COL)* conforman una familia de factores de transcripción (TF) presentes en las plantas. El primer *COL* descrito se identificó en *Arabidopsis* (Putterill *et al.*, 1995). La característica que define a esta familia de TF es la presencia de (i) un motivo CCT (**C**ONSTANS, **C**ONSTANS-like y **T**IMING OF CAB EXPRESSION 1), con una longitud aproximada de 45 aminoácidos, en la posición carboxilo terminal, y (ii) la presencia de dos motivos B-box en tándem, con sus respectivos dedos de zinc formados por cuatro residuos de cisteína con una estructura conservada (C-X2-C-X16-C-X2-C) en la posición amino terminal (Putterill *et al.*, 1995). El dominio CCT está involucrado en la localización nuclear de la proteína, mientras que los dominios B-box se relacionan con la interacción proteína-proteína (Robson *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, la familia de TF AtCOL está formada por 17 genes (*AtCO* y *AtCOL 1-16*) y se organiza en tres grupos, dependiendo de los dominios que presenten (Griffiths *et al.*, 2003):

- **Grupo 1** → Consta de dos motivos B-box en el extremo 5', un motivo CCT en el extremo 3', cuatro regiones intermedias conservadas (M1-M4) y una región muy conservada situada justo en el extremo 3'. En la secuencia nucleotídica genómica existe un único intrón entre las regiones M3 y M4. En este grupo se incluyen *AtCO* y *AtCOL1* a *AtCOL5*.
- **Grupo 2** → Consta de un único motivo B-box en el extremo 5', un motivo CCT en el 3' y un intrón antes del motivo CCT. Este grupo está formado por *AtCOL6* a *AtCOL8* y *AtCOL16*.
- **Grupo 3** → Consta de dos motivos B-box en el extremo 5', el segundo de ellos con una estructura un poco diferente al primero, y un motivo CCT en el 3'. La secuencia genómica consta además de tres intrones. Este grupo está formado por *AtCOL9* a *AtCOL15*.

La función de la proteína CO en *Arabidopsis* se relaciona con la respuesta al fotoperiodo y la activación de la floración como respuesta al mismo (ver apartado anterior 1.1.1 Ruta dependiente del fotoperiodo y calidad de la luz y **Figura 1**). Además de en *Arabidopsis*, CO ha sido clonado y caracterizado en numerosas especies como arroz (*Oryza sativa*; Yano *et al.*, 2000), patata (*Solanum tuberosum*; Martínez-García *et al.*, 2002), uva (*Vitis vinífera*, Almada *et al.*, 2009), manzana (*Malus domestica*; Hattasch *et al.*, 2008), melocotón (*Prunus persica*; Zhang *et al.*, 2015) o chopo (*Populus deltoides*; Yuceer *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2012). Estas proteínas homologas están implicadas en el control por el

fotoperiodo de procesos del desarrollo de la planta que incluyen la floración en numerosas especies y el cese del crecimiento estacional y formación de yemas en árboles. Por tanto, aunque sus secuencias han divergido evolutivamente parecen conservar su función sobre la regulación de la floración por el fotoperiodo. Por ejemplo, la sobre-expresión de *PdCO1* y *PpCO* (homólogos a *AtCO* en chopo y melocotón) en *Arabidopsis* es capaz de revertir el fenotipo de los mutantes *co-1* y *co-2* respectivamente (ambos con retraso en la floración), (Hsu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). A su vez, algunas proteínas CO han adquirido otras funciones adicionales a las mostradas en *Arabidopsis*. Así, la proteína StCO de patata es capaz de inhibir la tuberización en SD (Martínez-García *et al.*, 2002) y *Hd1*, homólogo de *AtCO* en la especie de floración de SD *Oryza sativa* (arroz) promueve la floración en condiciones de SD y la inhibe en LD (Yano *et al.*, 2000).

Un gen con homología a CO ha sido identificado en la fresa del bosque *Fragaria vesca*, en un estudio en el que se identifican otros 66 genes relacionados con la floración en esta especie (Mouhu *et al.*, 2009). Al analizar la expresión relativa de *FvCO* en una accesión de floración estacional (SD) y en el cultivar de DN 'Baron Solemacher', no obtuvieron diferencias significativas de expresión, ni en hoja ni en corona. Actualmente, no se conoce el efecto que la sobre-expresión o el silenciamiento de *FvCO* tiene sobre el inicio de la floración en fresa.

1.2.2 El complejo de activación FLOWERING LOCUS D (FD) y FT.

FLOWERING LOCUS D (FD) es un factor de transcripción bZIP, familia de proteínas que regulan muchos procesos en la plantas, desde defensa frente a patógenos, estrés abiótico o floración (Jacoby *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* se trata de una familia muy extensa, con más de 75 miembros, de los que aproximadamente 50 no se encuentran descritos en la bibliografía (Jacoby *et al.*, 2002). La expresión de *FD*, en *Arabidopsis*, se localiza principalmente en el núcleo de las células del meristemo apical, no muestra oscilaciones circadianas en su expresión, y no está afectada por el fotoperiodo o por la actividad de CO (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). FLOWERING LOCUS D actúa conjuntamente con FT, formando un complejo mediante interacción proteína a proteína, para activar la expresión de genes de identidad floral y por tanto la floración (ver apartado anterior 1.1.1 Papel central del *FLOWERING LOCUS T* y **Figura 1**).

Entre los 66 genes relacionados con la floración identificados en *F. vesca* por Mouhu *et al.* (2009) se encuentra un EST al que identificaron como *FvFD* (NCBI ID: EX675574; que se corresponde con el *FvGene08566-v1.0-hybrid* en este trabajo). La expresión de *FvFD* (que se corresponde con el *FvGene14556-v1.0-hybrid* en este trabajo y

homólogo a *AtFD*) en *F. vesca*, medida en corona, no se ve afectada por el fotoperiodo (Rantanen *et al.*, 2015).

1.2.3 Factores de transcripción tipo MADS relacionados con la floración.

La familia de factores de transcripción MADS es una de las más y mejor estudiadas en plantas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Folter *et al.*, 2005; Díaz-Riquelme *et al.*, 2009; Smaczniak *et al.*, 2012). Los miembros de esta amplia familia, con más de 100 genes descritos en *Arabidopsis* (Smaczniak *et al.*, 2012) juegan un papel muy importante en numerosos procesos del desarrollo de las plantas. Se caracterizan por la presencia de un dominio **MADS** [por **Minichromosome maintenance 1** (Mcm1; Passmore *et al.*, 1988), **AGAMOUS** (AG; Yanofsky *et al.*, 1990), **DEFICIENS** (DEF; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990) y **Serum response factor** (SRF; Norman *et al.*, 1988)] muy conservado situado en el extremo 5'. El dominio MADS es responsable de la unión al ADN (parte inicial y central del dominio) y de la interacción proteína-proteína (parte final). Los genes MADS se dividen en dos grandes subgrupos. El grupo 1, es un grupo heterogéneo cuya similitud se limita a la presencia del dominio MADS. El grupo 2, los llamados MICK, se encuentra más estudiado y se caracteriza porque los genes tienen una estructura modular, compuesta por cuatro dominios. El dominio MADS en el extremo 5', seguido por un dominio I (intervening) y por un dominio K (keratin-like) esenciales para la dimerización y formación de complejos proteicos y por último, en el extremo 3' un dominio C-terminal, responsable en parte de la estructura y la regulación post-transcripcional de la proteína (Smaczniak *et al.*, 2012). Dependiendo de la estructura de estos dominios, los MICK se dividen a su vez en MICK* y MICK^C.

Los genes MICK^C a su vez se dividen en trece subfamilias, según su filogenia y la mayoría tienen su origen en los ancestros de las plantas con semillas. Se suelen nombrar a partir del primer miembro descrito dentro de cada subfamilia (Smaczniak *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* los genes MICK y en concreto los MICK^C tienen funciones muy diversas, interviniendo en procesos tan dispares como el desarrollo de la raíz (Zang y Forde, 1998; Tapia-López *et al.*, 2008), la semilla (Köhler *et al.*, 2005) o el endospermo (Bemer *et al.*, 2008). Actúan como reguladores de ciclo celular y el destino meristemático (Gu *et al.*, 1998; Ferrandiz *et al.*, 2000; Melzer *et al.*, 2008). Algunos son genes homeóticos, integrantes del Modelo ABCDE del desarrollo y formación de los órganos florales (Yanofsky *et al.*, 1990; Jack *et al.*, 1992; Mandel y Yanofsky, 1998; Ditta *et al.*, 2004). Dentro de este amplio grupo de genes nos encontramos a *APETALA 1*, *3* y *PISTILLATA* (representantes de la subfamilia DEF/GLO); *AGAMOUS*, *SEEDSTICK* y *SHATTERPROOF 1, 2* (miembros de la subfamilia AG) y *SEPALLATA 1* a *4* (miembros de la subfamilia SEP) (Smaczniak *et al.*, 2012). Por último, existen algunos que intervienen en la inducción y/o

represión de la floración (Adamczyk *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008). Entre estos últimos nos encontramos a la subfamilia FLC (FLC y MAF1-5), como represor de la floración al que hicimos referencia al hablar de la vernalización (apartado 1.1.2) y del control autónomo de la floración (apartado 1.1.3) (Michaels y Amasino, 1999; Searle *et al.*, 2006). El papel represor de FLC es reforzado por la interacción del mismo con SVP, componente de la subfamilia SVP de factores MICK^C. SVP, además interviene en la represión de la floración por la vía autónoma y por la vía mediada por giberelinas (apartados 1.1.3 y 1.1.4) (Li *et al.*, 2008). Dentro de los genes MICK^C que actúan como inductores de la floración se encuentran SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1; Lee y Lee, 2010; Moreno-Risueño *et al.*, 2010) y AGAMOUS LIKE 6 (AGL6; Koo *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2011).

1.2.3.1 El activador floral SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1) es un factor de transcripción tipo MADS.

SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1) actúa como un FPI en *Arabidopsis*, respondiendo e integrando múltiples señales derivadas de la respuesta frente al fotoperiodo, la temperatura, las hormonas y señales provenientes de la vía autónoma (Yoo *et al.*, 2005; Lee y Lee, 2010, Immink *et al.*, 2012). Cuando SOC1 es inducido en el meristemo, SOC1 junto con AGL24 activan directamente a LEAFY (LFY), gen encargado de la inducción floral del meristemo (Lee *et al.*, 2008). SOC1 puede ser inducido por CO y el microRNA176, vía FT (Aukerman y Sakai, 2003) o por giberelinas, vía SPL3, 4, 5 y 9 (Blázquez *et al.*, 1998; Porri *et al.*, 2012). A su vez, SOC1 es reprimido por FLC, mediante unión directa al promotor de SOC1 o regulado, mediante un mecanismo dependiente del desarrollo de la planta, por el microRNA156, vía SPL3, 4, 5 y 9 (Aukerman y Sakai, 2003; Lee y Lee, 2010) **Figura 1.**

La función de SOC1 ha sido estudiada en otras especies de plantas, como crisantemo (*Chrysanthemum ssp.*; Fu *et al.*, 2013), peonía (*Paeonia ssp.*, Wang *et al.*, 2015), vid (Sreekantan y Thomas, 2006), cedro japonés (*Cryptomeria japonica*, Katahata *et al.*, 2014), albaricoque (*Prunus armeniaca*, Trainin *et al.*, 2013) o peral (*Pyrus pyrifolia*, Ubi *et al.*, 2013). En crisantemo, los genes CISOC1-1 y CISOC1-2 se expresan en todos los órganos estudiados: hojas, SAM, peciolos, tallos y raíces. La sobre-expresión de ambos genes en *Arabidopsis* adelantó la floración e indujo la expresión de LEAFY (Fu *et al.*, 2013). En peonía, SOC1 también se expresa en tejidos reproductores y vegetativos. Su expresión se ve afectada por giberelinas, bajas temperaturas y fotoperiodo. La sobre-expresión en plantas de tabaco aumentó el crecimiento vegetativo y aceleró la floración (Wang *et al.*, 2015). La expresión de VvMADS8 (homólogo en la vid a AtSOC1) en *Arabidopsis* acelera la floración (Sreekantan y Thomas, 2006). En el cedro japonés, el homólogo de AtSOC1, CjMADS15 se expresa en todos los tejidos estudiados, especialmente en las hojas y los

estróbilos (conos o piñas), a excepción del polen. La expresión de *CjMADS15* aumenta transcurrida una semana de un tratamiento con giberelinas. Al igual que ocurre en crisantemo y vid, la sobre-expresión de *CjMADS15* aceleró la floración en *Arabidopsis* (Katahata *et al.*, 2014). En albaricoque, Trainin *et al.*, (2013), encontraron que *ParSOC1* es altamente polimórfico, identificando hasta trece alelos diferentes entre 48 cultivares distintos, existiendo correlaciones significativas entre la presencia de determinados alelos y los requerimientos de horas/frío necesarios para romper la dormancia de las yemas florales.

El gen de *FvSOC1* de *F. vesca*, ha sido clonado hace unos años y mostró un 66% de identidad en su secuencia de aminoácidos con su homólogo de *Arabidopsis* (Mouhu *et al.*, 2009). Posteriormente, Mouhu *et al.* (2013) vuelven a confirmar mediante análisis filogenéticos más precisos y extensos la homología de *FvSOC1* con *AtSOC1* y su agrupamiento en el mismo cluster. Además, la sobre-expresión de *FvSOC1* en *Arabidopsis* adelantó el inicio de la floración, tanto en SD como LD, demostrando que se trata del ortólogo en la fresa (Mouhu *et al.*, 2013). Un resultado similar fue obtenido al expresar un gen homólogo de la fresa cultivada *F. × ananassa* cv. Camarosa en *Arabidopsis* (Lei *et al.*, 2013). El análisis de la expresión de *FvSOC1* en distintos tejidos/órganos de fresa, mostró expresión en todos ellos (hoja, peciolo, coronas secundarias, estolones y corona) excepto botones florales y flores (Mouhu *et al.*, 2013). Sorprendentemente, se observó que la expresión de *FvSOC1* es mayor en condiciones de LD que SD tanto en hojas como coronas. Hay que recordar que la mayoría de las accesiones de *F. vesca* florecen en condiciones de SD (apartado 2.3.1). Estos resultados sugieren que *FvSOC1* tiene una regulación estacional similar a *FvTFL1*, con lo que su expresión disminuye (correlación negativa) en las condiciones inductivas para la floración en las accesiones de fresa con floración estacional (SD). En 'Hawaii-4' (accesión de *F. vesca* de DN) *FvSOC1* también sufre una regulación estacional de su expresión, ya que la expresión de *FvSOC1* es mayor en condiciones de LD que SD (Mouhu *et al.*, 2013). A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, la sobre-expresión de *FvSOC1* en *F. vesca* reprimió la floración en SD, mientras que el silenciamiento de *FvSOC1* mediante RNA interferente (RNAi) resultó en que las plantas se comporten como plantas de DN, al igual que ocurre en los mutantes en *FvTFL1* (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012; Mouhu *et al.*, 2013; Rantanen *et al.*, 2015). En lo que se refiere al crecimiento vegetativo, tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de *FvSOC1* alteraron el crecimiento vegetativo y el vigor (medido como longitud del peciolo) de las plantas (Mouhu *et al.*, 2013). Las plantas con sobre-expresión mostraron peciolo más largos y una elongación del tallo acusada, mientras que las líneas silenciadas presentaron un aspecto tupido y compacto. La producción de estolones también se ve afectada, las plantas que sobre-expresan *FvSOC1* estolonan

continuamente, con independencia del fotoperiodo; mientras que en las plantas silenciadas la formación de estolones cesa tras dos o tres semanas tanto en SD como LD. Estos autores mostraron que estos efectos sobre el crecimiento vegetativo ocurren mediante rutas dependientes de GA, a diferencia de los efectos de FvSOC1 sobre la floración que parecen ocurrir por vías independientes de GAs.

1.2.3.2 La función de *AGAMOUS LIKE 6 (AGL6)* en la floración.

El factor de transcripción *AGAMOUS LIKE 6 (AGL6)* fue uno de los primeros genes MADS-box identificados en *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 1991) aunque su función biológica no se conocía hasta recientemente (Koo *et al.*, 2010). *AGL6* regula la transcripción de dos importantes reguladores florales en el núcleo de las células de la hoja de *Arabidopsis*, como son *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Yoo *et al.*, 2011a). La acción sobre cada uno de ellos es antagónica e independiente, regulando positivamente la expresión de *FT* y negativamente la de *FLC*, y también *MAF4* y *MAF5*, promoviendo la floración independientemente del fotoperiodo. Así, la sobre-expresión de *AGL6* resulta en floración temprana tanto en SD como LD. Koo *et al.*, (2010) también describen una mayor expresión de *FT* en la hoja de plantas que sobre-expresan *AGL6*. Un estudio de mutantes afectados en la frecuencia de oscilación de las hojas identificó a *AGL6* como una proteína potencialmente implicada en la regulación del reloj circadiano en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2011b). Así mismo, *AGL6* y en particular determinados alelos parecen tener una función en la activación de la formación de meristemas axilares (Huang *et al.*, 2012).

La actividad de *AGL6* ha sido estudiada en otras especies, como arroz (Ohmori *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011), vid (Boss *et al.*, 2002) o cedro japonés (Katahata *et al.*, 2014). En arroz, *OsMADS6* (gen homólogo a *AtAGL6*) parece ser un gen clave en el desarrollo de la flor y los órganos que la componen, al interactuar con otros genes homeóticos (Ohmori *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). En vid la expresión de *VvMADS3* se restringe a la flor, no detectándose expresión en las hojas, la raíz o el fruto, patrón de expresión diferente al observado en *Arabidopsis* donde se observa expresión también en tejidos vegetativos como las hojas (Koo *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2011a; Yoo *et al.*, 2011b). En el cedro japonés, el gen homólogo a *AtAGL6* en esta gimnosperma, *CjMADS14*, se expresa mayoritariamente en los estróbilos (conos o piñas; tanto masculinos como femeninos) y en menor medida en tallos y agujas (hojas) (Katahata *et al.*, 2014). Además la expresión ectópica de *CjMADS14* en *Arabidopsis* adelantó la floración indicando su potencial en la activación de la inducción floral.

2. El género *Fragaria*.

2.1 Taxonomía y distribución geográfica.

El género *Fragaria* (*Fragaria spp.*, del latín *fragans*, oloroso) pertenece a la familia *Rosaceae*, que agrupa unas 3000 especies de 107 géneros diferentes, distribuidas en su mayor parte en las zonas cálidas del hemisferio norte (Dirlewanger *et al.*, 2002). Se trata de la tercera familia de plantas con mayor importancia económica en el mundo, ya que además de la fresa, incluye especies frutales pertenecientes a géneros como *Prunus* (melocotonero, albaricoquero, ciruelo, cerezo o almendro), *Malus* (manzano), *Pyrus* (peral) o *Rubus* (moras y frambuesas), así como especies de uso ornamental como las pertenecientes al género *Rosa* (con más de 5000 cultivares registrados), *Potentilla* o *Sorbus*.

La fresa es una planta dicotiledónea del género *Fragaria*. Su clasificación sistemática es:

- Reino: *Plantae*
- Subreino: Embryobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: *Rosidae*
- Superorden: *Rosanae*
- Orden: Rosales
- Familia: *Rosaceae*
- Subfamilia: *Rosoideae*
- Tribu: Potentilleae
- Subtribu: Fragariinae
- Género: *Fragaria*

El género *Fragaria* comprende unas 25 especies e híbridos que poseen diferentes niveles de ploidía: diploides ($2n = 14$), tetraploides ($2n = 28$), hexaploides ($2n = 42$), octoploides ($2n = 56$) y decaploides ($2n=70$) (Hancock, 1999; Hummer *et al.*, 2009; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009) y se distribuyen por toda la zona templada del hemisferio norte, ocupando diferentes regiones climáticas que van desde los climas templados a zonas subtropicales y al oeste de Sudamérica (Staudt, 2008; Liston *et al.*, 2014). Solo la especie *F. vesca* ($2n = 14$) se distribuye de manera homogénea a lo largo de todo este rango (Hancock, 1999). El resto de especies diploides están confinadas en Eurasia (**Figura 2**), las tetraploides al este de Asia y *Fragaria moschata*, la única especie hexaploide, a

Europa central y Siberia (Staudt, 1989). Las especies octoploides de *Fragaria* son nativas de América. La fresa cultivada es un híbrido obtenido por el cruzamiento de dos especies octoploides: *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*. Su origen se remonta al siglo XVII cuando ambas especies son introducidas en Europa. La polinización cruzada produjo híbridos, con frutos grandes, dulces y aromáticos. Duchesne nombra a este híbrido como fresa-ananás o fresa-piña y poco después la clasifica como *F. × ananassa* Duch., híbrido que hoy se cultiva en todo el mundo (Medina-Mínguez, 2008) (más información en el apartado 2.5).

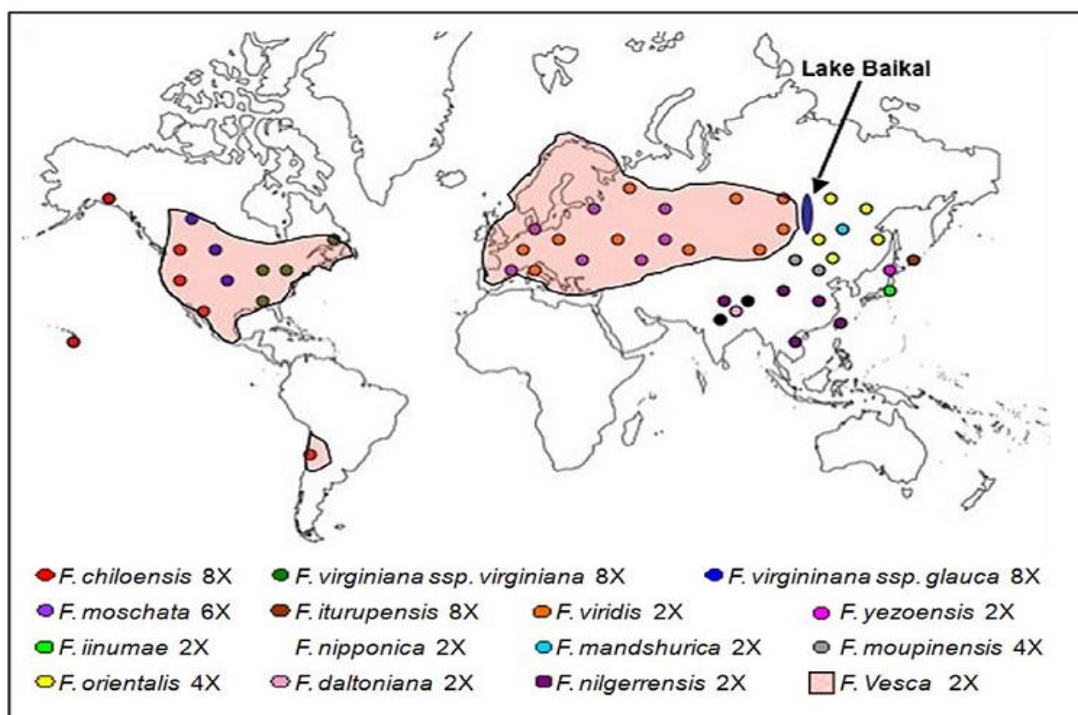


Figura 2. Distribución geográfica y nivel de ploidía de las especies silvestres de *Fragaria* (adaptado de Staudt, 2008).

2.2 Características botánicas de la fresa.

La fresa es una planta leñosa y perenne (de porte herbáceo), con unas pautas fisiológicas parecidas a los árboles y arbustos frutales de hoja caduca (Hancock, 1999; Foltá y Gardiner, 2009). El tallo se encuentra comprimido en una roseta llamada corona cubierta por unas hojas basales o estipulas solapadas. La corona produce entrenudos muy cortos con hojas pecioladas trifoliadas, de bordes aserrados; el meristemo apical (SAM) en posición terminal y sistema radicular fasciculado, en su parte basal. Además en la axila de cada hoja nos encontramos las yemas o meristemos axilares. Estos meristemos, dependiendo del estado nutricional y las condiciones ambientales, evoluciona a: ramas (nuevas coronas), estolones, o bien permanecen en dormancia. A partir del SAM o del meristemo apical de una corona secundaria surge el escapo floral que porta la inflorescencia. El tallo que soporta cada flor individual se llama pedúnculo floral. El

conjunto de escapo y pedúnculo floral forma el ramo floral. Las flores presentan 10 sépalos, 5 o 6 pétalos, de 20 a 30 estambres (dispuestos en dos verticilos concéntricos) y varios cientos de pistilos (60 a 600). Los pistilos se disponen en espiral sobre el receptáculo floral y cada uno porta un único óvulo (Hancock, 1999; Folta y Gardiner, 2009). El receptáculo floral se desarrolla y se engrosa formando la fresa, mal llamada fruto, ya que los verdaderos frutos son los aquenios que tapizan el receptáculo floral engrosado. Los aquenios se desarrollan a partir de un único ovario y están formado por tejidos procedentes del ovario y la semilla. El “fruto” de fresa puede tener entre 20 y 500 aquenios. El tamaño del “fruto” es una característica varietal y depende de muchos factores: posición/tamaño de la flor, número/tamaño de los aquenios, estado fisiológico y factores ambientales. La fresa está considerada como un “fruto” no climatérico (Figura 3).

Los estolones, responsables de la multiplicación vegetativa de la fresa, son tallos rastreros; cada planta puede producir entre 10 y 15 sistemas estoloníferos, pudiendo dar lugar a más de 100 plantas hijas (clones). Cuando la yema terminal de un estolón da lugar a una planta hija, la yema axilar situada en el segundo nodo del estolón produce la siguiente unidad simpodial. Las plantas hijas son autosuficientes pasadas 2-3 semanas de vivir unida a la planta madre a través de los filamentos estoloníferos. La capacidad de estolonado es una característica varietal (Darrow, 1966) (Figura 3).

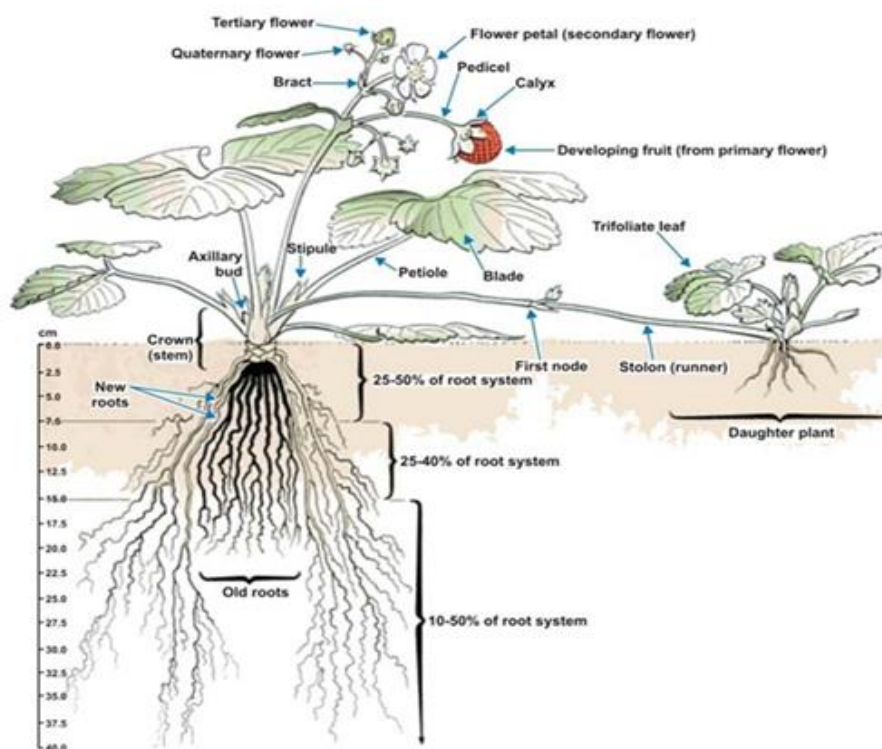


Figura 3. Morfología de la planta de fresa (daptado de Strand, 2008)

2.3 Fisiología de la fresa.

2.3.1 Comportamiento frente al fotoperiodo.

Las plantas pueden ser clasificadas en tres grandes categorías basándonos en su respuesta frente al fotoperiodo: plantas de día corto (SD) que florecen cuando la duración del día es menor que un punto crítico (que varía según la especie), plantas de día largo (LD) que florecen cuando la duración del día supera un punto crítico (variable según la especie), y por último especies con un comportamiento neutro frente al fotoperiodo (DN) capaces de florecer independientemente del fotoperiodo (Garner y Allard, 1920). La mayoría de especies de fresa se comportan como plantas de SD (Darrow, 1966), así como la mayoría de las variedades de fresa cultivada (*F. × ananassa*), en las que la inducción floral ocurre cuando los días se acortan durante el otoño, seguidos por un periodo de reposo invernal y floreciendo en la primavera siguiente (Guttridge, 1985). La duración crítica del día es muy dependiente del cultivar, pero en general se estipula entre 8 y 14 horas, estando el punto óptimo entre 8 y 11 horas (Heide, 1977; Durner, 1984; Guttridge, 1985; Konsin *et al.*, 2001; Verheul *et al.*, 2007). Los cultivares varían en su sensibilidad a las condiciones inductoras de floración y al número de días necesarios para inducir la floración, comprendido entre 7 y 23 como promedio (Guttridge, 1985; Konsin *et al.*, 2001; Sønsteby y Heide, 2008).

Algunas especies octoploides se comportan como DN, también conocidas como everbearing (EB). En la fresa cultivada, este carácter puede proceder de tres fuentes diferentes. La primera fuente se remonta a la introducción en Francia (1866) de las líneas 'Gloede's Seedling' (Ahmadi *et al.*, 1990). La segunda fuente se desarrolló en USA, donde 'Pan American' se introdujo en 1890 (Darrow, 1966). La tercera fuente, se trata de *F. virginiana glauca* origen de muchas de los cultivares DN modernos como 'Brighton', 'Fern' o 'Selva' (Ahmadi *et al.*, 1990). La regulación genética de este carácter se discute hoy día. Ahmadi *et al.*, (1990) sugirió que en las variedades derivadas de *F. virginiana glauca* el carácter (DN) lo confiere un único gen dominante, pero más tarde se sugirió que lo más probable es que se trate de un carácter poligénico, controlado por un quantitative trait loci (QTL) mayor y otros con menor contribución (Serçe y Hancock, 2005; Shaw y Famula, 2005; Weebadde *et al.*, 2008). En 2013, Gaston *et al.* mostraron que el QTL *FaPFRU*, localizado en el grupo de homeología (HG) IV controla gran parte de la variación en este carácter (sobre el que ejerce un efecto positivo) y del estolonado (sobre el que ejerce un efecto negativo). De igual forma, Sooriyapathirana *et al.* (2015) identificaron varios QTL que controlan el tipo de floración, uno mayoritario localizado también en el HG IV, con un efecto similar sobre la floración y el estolonado que *FaPFRU*; y otro QTL adicional con un efecto menor, localizado en el HG V. Además, detectaron QTLs con efectos menores y

afectando el inicio de la floración en el HG III. Estos resultados sugieren que el carácter de día neutro está controlado por un gen de efecto mayoritario y varios otros genes con efectos menores tal como sugirieron Shaw y Famula en 2005. Al igual que Gaston *et al.*, 2013, Sooriyapathirana *et al.* (2015) detectaron varios QTLs para el estolonado (además del identificado en el HG IV) localizados en los HG I y II.

El fotoperiodo afecta al crecimiento vegetativo no solamente a la floración. Condiciones de LD favorecen el crecimiento vegetativo (medido por parámetros como la longitud del pedúnculo) y el estolonado, mientras que condiciones de SD los inhiben (Heide, 1977; Durner, 1984; Sønsteby y Nes, 1998; konsin *et al.*, 2001; Hytönen *et al.*, 2009).

2.3.2 Comportamiento frente a la temperatura ambiente.

La temperatura afecta en gran medida a la floración en la fresa. La mayoría de cultivares de SD son en realidad plantas de SD facultativas: cuando las temperaturas caen por debajo de un determinado valor, la floración se induce independientemente del fotoperiodo (Guttridge, 1985). El rango de temperaturas donde la floración es dependiente del fotoperiodo se sitúa entre 14 y 20 °C (Durner, 1984; Guttridge, 1985; Manasakem y Goodwin, 2001; Heide y Sønsteby, 2007). Mientras que temperaturas por encima de 20 °C inhiben la floración independientemente del fotoperiodo (Durner, 1984; Guttridge, 1985; Manasakem y Goodwin, 2001). Todos estos rangos de temperatura, en los que la floración es inducida, inhibida o supeditada al fotoperiodo son muy dependientes del cultivar. Así, una misma temperatura, puede producir distintas respuestas según el cultivar que estudiemos. La considerable variación entre cultivares en su respuesta a la duración del día, los requerimientos de temperatura y la interacción de ambos en la inducción de la floración, permiten a la fresa ser cultivada en un amplio abanico de condiciones ambientales y latitudes; pero a la vez dificulta la caracterización de los cultivares, ya que un mismo cultivar puede comportarse como DN o como SD con solo cambiar la temperatura (Durner, 1984; Manasakem y Goodwin, 2001; Heide y Sønsteby, 2007).

La temperatura también afecta al destino de las yemas axilares. Temperaturas cálidas mejoran el estolonado tanto en cultivares de SD como LD (Heide, 1977; Durner, 1984; konsin *et al.*, 2001; Hytönen *et al.*, 2009; Bradford *et al.*, 2010).

2.3.3 Ciclo de crecimiento habitual de *Fragaria* × *ananassa* en Andalucía. Particularidades del sistema de producción Español.

Como se explica en los apartados anteriores no todas las variedades responden de igual manera a los cambios ambientales (Heide, 1977; Durner, 1984; Guttridge, 1985). En el caso concreto de Andalucía, la gran mayoría de las variedades que se siembran son de floración estacional de día corto. Y debido a que las temperaturas durante el otoño en nuestra latitud no son muy bajas, se hace necesario separar la producción de fresa de la multiplicación de las plantas, para obtener una adecuada sincronía en la floración, así como una producción temprana. La multiplicación de las plantas se realiza en viveros de altura, localizados en la meseta norte del país, durante los meses de abril a octubre. Posteriormente, las plantas se trasladan hasta los campos de producción. Ubicados mayoritariamente en la provincia de Huelva, donde se pasan a suelo a principio o mediados de octubre (López-Aranda, 2008), pasados dos días de traslado desde los viveros de altura (**Figura 4**).

Estas plantas, al haber adquirido las horas de frío (durante el mes de Septiembre) necesarias para superar los requisitos de vernalización en los viveros de altura, sufren la inducción de la floración durante el mes de Octubre y Noviembre (fotoperiodo de SD), empezando a florecer a lo largo de Diciembre. Debido a que las temperaturas no son muy bajas en Huelva durante los meses de noviembre y diciembre, la planta no sufre parón invernal o dormancia, habitual en latitudes más norteñas. La fresa produce frutos durante los primeros seis meses del año, con la máxima producción entre los meses de febrero, marzo, abril y parte de mayo, a partir de los cuales la producción comienza a caer por las elevadas temperaturas. En el mes de julio, tras el alargamiento de los días (LD), comienza la época de crecimiento vegetativo y estolonado, que se alarga mientras las temperaturas y el fotoperiodo lo permiten, normalmente hasta mediados o finales de septiembre, en el caso del estolonado y diciembre en el caso del crecimiento vegetativo. Si las temperaturas en verano son muy altas, puede producirse un parón estival (López-Aranda, 2008) (**Figura 4**). Al tratarse de un cultivo intensivo, las plantas no llegan a completar su ciclo de vida en los campos de producción, ya que normalmente son arrancadas al final de mayo, permitiendo la desinfección y acondicionamiento del suelo durante los meses de verano, a la espera de nuevas plantas de los viveros en el otoño siguiente (**Figura 4**).

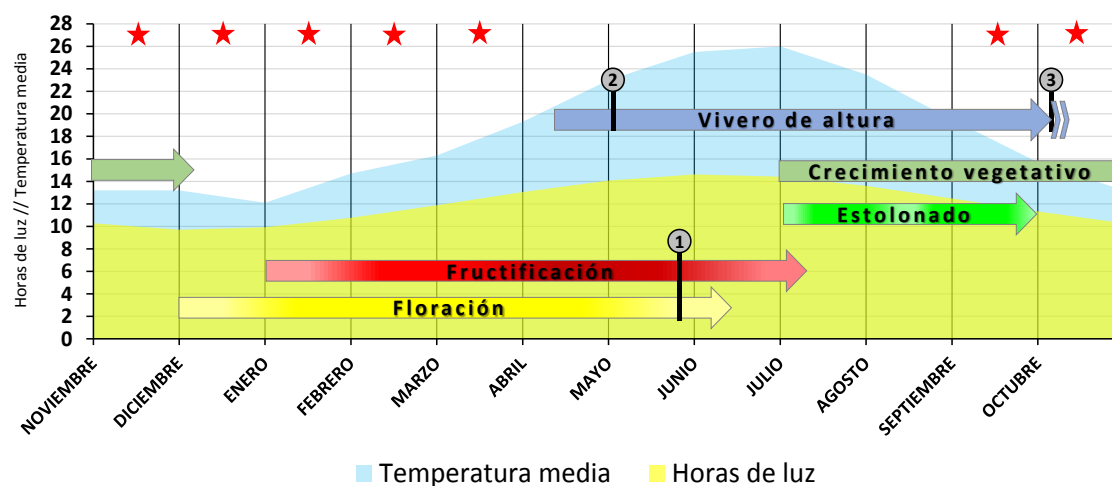


Figura 4. Esquematación del ciclo de crecimiento de variedades de *F. x ananassa* con floración estacional (*SD*) en Andalucía. Con estrella roja se marcan aquellos meses de fotoperiodo inferior a 13 horas (*SD*). ① Fecha de levantamiento del campo en Huelva. ② Inicio de estolonado en los viveros de altura, multiplicación vegetativa. ③ Fecha de arrancado de plantas en los viveros de altura y traslado a los campos de producción de Huelva.

2.3.4 Efecto de las giberelinas en el crecimiento de la fresa.

Las giberelinas (GAs) son una familia de fitohormonas que promueven la división y la elongación celular a la vez que están involucradas en el crecimiento y desarrollo de los órganos de las plantas (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). Las formas activas de las GAs se forman a partir del difosfato de geranilgeranilo mediante doce etapas sucesivas, en una ruta metabólica catalizada por seis enzimas. Las principales etapas de regulación de la ruta se sitúan al final de la misma, donde actúan varias dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, como GA20 oxidasa (GA20ox) y GA3 oxidasa (GA3ox), que catalizan la formación de GAs activas. GA20ox cataliza tres etapas en la biosíntesis de GA, desde GA_{12,53} hasta el último precursor de las GAs activas (GA_{9,20}). GA3ox cataliza la hidroxilación en posición 3 β de los precursores GA₉ y GA₂₀ hasta formar las GAs activas: GA₄ y GA₁. Las GAs activas son inactivadas mediante hidroxilación en posición 2 β , reacción catalizada por la enzima GA2oxidase (GA2ox, otra dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato), mediante un mecanismo de retroalimentación en el cual las GAs activas reprimen la expresión de GA20ox y GA3ox a la vez que activa la expresión de GA2ox (**Figura 5**). Existen dos rutas alternativas para la producción de GAs: la hidroxilación del carbono en posición 13 (13-OH) y la hidroxilación del carbono en posición 3 (non-13-OH). Ambas rutas se han descrito presentes en la fresa, la ruta 13-OH se localiza en hojas, tallos, yemas axilares, receptáculo y frutos, mientras que la ruta non-13-OH se localiza en los peciolos (Taylor *et al.*, 1994; Wiseman y Turnbull, 1999a y 1999b; Hytönen *et al.*, 2009; Symons *et al.*, 2012).

Las GAs tienen un importante efecto en el crecimiento y la floración de la fresa. Tratamientos con GA₄ promueven la elongación de peciolo (Guttridge y Thompson, 1964; Wiseman y Turnbull, 1999a y 1999b). Y tratamientos con GA₁ promueven el desarrollo del tallo y la formación de estolones (Hytönen *et al.*, 2009), a la vez que reprimen la inducción floral de plantas crecidas bajo condiciones inductivas de floración (Braun y Kender, 1985; Braun y Garth, 1986). La aplicación de inhibidores de la biosíntesis de GA reprime la elongación del peciolo e induce el desarrollo de coronas secundarias a partir de las yemas axilares, reduciendo la producción de estolones (Wiseman y Turnbull, 1999a y 1999b; Black, 2004; Hytönen *et al.*, 2008 y 2009). Las GAs promueven el crecimiento vegetativo al promover la degradación de las proteínas DELLA (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009; Sun, 2011). Las GAs se unen al receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) el cual al interactuar con las proteínas DELLA promueve su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Sun, 2011) (Figura 5).

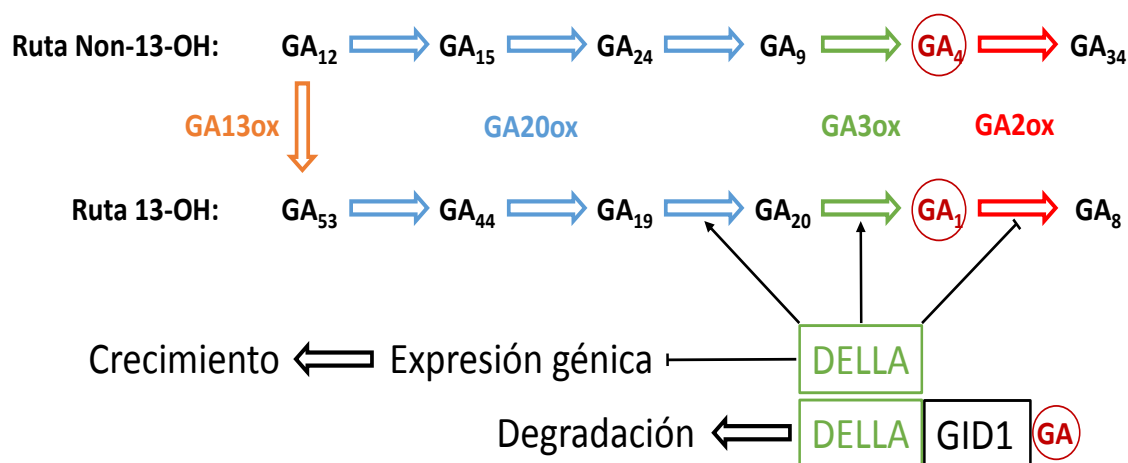


Figura 5. Tres últimas etapas de la síntesis de giberelinas (GA). Ambas rutas (non-13-OH y 13-OH) comienzan con GA₁₂. A partir de este precursor se forman sucesivamente el resto de intermediarios, según la oxidasa que actúe (representadas por flechas en diferentes colores) hasta formar la giberelina biológicamente activa (rodeada por un círculo en rojo). La unión de la giberelinas activa con el receptor GID1 promueve la degradación de DELLA. A su vez DELLA (en ausencia de GA activas) regula su propio recambio al promover (flechas en negro) la biosíntesis de GA activa e inactivar su degradación (barras negras).

2.4 *Fragaria vesca* como especie modelo del género *Fragaria*.

F. vesca se ha convertido en la planta modelo en la que se basan muchos de los estudios dentro del género *Fragaria* y otras *Rosaceas*. El uso de la fresa silvestre presenta numerosas ventajas sobre la fresa cultivada: tiene un tiempo de generación más corto, aproximadamente de tres a cuatro meses hasta la obtención de nuevas semillas, tiene un tamaño menor, es fácilmente multiplicable por estolones y posee un genoma diploide y de pequeño tamaño, 240 Mbp (Folta y Davis, 2006; Davis *et al.*, 2007). Además, la fresa silvestre es autógama facultativa lo que facilita la obtención de líneas homocigotas (Slovin *et al.*, 2009). Existen métodos de cultivo y transformación *in vitro* muy eficientes, lo que

facilita el uso de herramientas genéticas para análisis funcionales y estructurales (El Mansouri *et al.*, 1996; Haymes y Davis, 1998; Alsheikh *et al.*, 2002; Oosumi *et al.*, 2006). Hoy en día la información disponible de *F. vesca* aumenta rápidamente en número de ESTs disponibles (Kang *et al.*, 2013; Darwish *et al.*, 2015). Además recientemente se completó y publicó la secuencia completa de su genoma, donde 34809 transcritos han sido identificados (Shulaev *et al.*, 2011).

La fresa cultivada (*F. × ananassa*), procedente de la hibridación de dos especies octoploides (de origen americano) *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, no es una especie muy adecuada para estudios genéticos y moleculares, por su genoma octoploide ($2n=8x=56$), tamaño y ciclo de vida relativamente largo. Existen tres modelos que intentan explicar el origen del octoploide de *F. × ananassa*: AAAABBCC (Fedorova, 1946), AAA'A'BBBB (Senanayake and Bringham, 1967) y AAA'A'BBB'B' (Bringham, 1990). El modelo más reciente, considera que el genoma octoploide tiene un origen aloploide. Estudios recientes han corroborado este modelo, sugiriendo un modelo: Y1Y1Y1'Y1'ZZZZ, en que *F. vesca* actuaría como donador del subgenoma Y1 y *F. iinumae*, el donador del subgenoma Z (Folta and Davis, 2006; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009; Tennessen *et al.*, 2014). Al ser *F. vesca* donador de uno de los cuatro subgenomas presentes en *F. × ananassa* hace que ambos genomas presenten una elevada macrosintenia (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009). La publicación del genoma completo de *F. vesca*, unido a la macrosintenia existente entre ambas especies facilita enormemente los estudios genómicos en *F. × ananassa*, aumentando el valor de *F. vesca* como especie modelo.

Al igual que *F. × ananassa*, la mayoría de las accesiones de *F. vesca* presentan floración facultativa bajo condiciones de SD: la floración se inhibe por encima de los 20 °C, para una correcta floración se necesitan temperaturas intermedias y condiciones de SD. Por último temperaturas inferiores a 10 °C inducen la floración independientemente del fotoperiodo (Heide y Sørensen, 2007; Heide *et al.*, 2013). Además, están descritas accesiones de fresa silvestre que florecen durante todo el año (floración perpetua), *F. vesca* ssp. *semperflorens*, originarias de los Alpes y llamadas normalmente fresas alpinas (Darrow, 1966, Ahmadi *et al.*, 1990).

Gracias a experimentos de cruzamiento de variedades de fresas silvestres de SD con variedades alpinas (Brown y Wareing, 1965) se demostró que la respuesta frente al fotoperiodo en la especie *F. vesca* está controlado por un único gen, llamado *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)*: el alelo dominante confiere floración estacional y el alelo recesivo floración perpetua (Albani *et al.*, 2004). Al igual que la floración estacional, el estolonado está también controlado por un único gen dominante, llamado *RUNNERING LOCUS (R)*; Brown y Wareing, 1965). Los genes *SFL* y *R* segregan de manera independiente,

SFL ha sido cartografiado en el grupo de ligamiento (LG) VI y *R* en el LG II en el mapa de referencia de *F. vesca* (Sargent *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Iwata *et al.*, 2012). Estudios más recientes han identificado mutaciones en el gen *FvTFL1* como responsables del carácter de floración perpetua en *F. vesca* y en la Rosa (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012).

2.5 La fresa cultivada *Fragaria* × *ananassa*.

2.5.1 Historia.

La fresa cultivada es una especie octoploide, se trata de un híbrido obtenido a partir del cruzamiento de dos especies también octoploides. Su origen se remonta al siglo XVII, cuando representantes de *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, originarios del oeste Sudamericano y el este de Norteamérica respectivamente, son introducidos en Europa y pasan a cultivarse conjuntamente en jardines hortícolas de Francia, Bélgica, Holanda, Alemania e Inglaterra. El origen europeo del nuevo taxón fue documentado por Duchesne en su libro “Historia Natural de las Fresas” en 1766. La polinización cruzada de ambas especies produjo híbridos con una combinación única de características de los dos progenitores, con unos frutos grandes, dulces y aromáticos. Duchesne nombra a este híbrido como fresa-ananás o fresa-piña, ya que su olor le recuerda al de la piña tropical (*Ananas ssp.*). Así, poco después la clasifica como *Fragaria* × *ananassa* Duch., híbrido que hoy se cultiva en todo el mundo (Medina-Mínguez, 2008).

La fresa cultivada muestra una gran capacidad de adaptación agroclimática, sin embargo, sus variedades comerciales o cultivares son de adaptación microclimática, adaptándose únicamente a condiciones similares a las que se usaron para su selección y obtención (Medina-Mínguez, 2008).

2.5.2 Importancia económica de la fresa cultivada.

La fresa cultivada, *F.* × *ananassa*, es un cultivo muy apreciado tanto por su sabor como por su contenido nutricional (azúcares, ácido fólico y ácido ascórbico entre otros) (Fait *et al.*, 2008) así como por los efectos saludables derivados de su consumo, entre los que se encuentran la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, envejecimiento, obesidad y cáncer (Seeram, 2008). Tanto es así, que se cultiva en gran cantidad de regiones y agro-ecosistemas diferentes, distribuidas por todo el planeta.

El cultivo y comercialización de la fresa, ha adquirido con el paso de los años, una gran importancia económica y social en España, siendo uno de los productos hortícolas con una mayor cuota de exportación (85,2 %) (Tabla 1 y Tabla 2). El grueso de la producción fresera en España, se encuentra localizado en la provincia de Huelva

(Andalucía), con algo más del 90% de la misma. Las condiciones edáficas y climáticas particulares de la provincia, muy favorables al cultivo, unido al dinamismo comercial y al elevado grado de tecnicidad alcanzado por el cultivo, han convertido a la fresa en el cultivo rey de la provincia. Ocasionando el despegue económico de una región tradicionalmente deprimida (Núñez, 2008).

El cultivo de la fresa en nuestro país, y en particular en Huelva, se centra en variedades con una floración estacional y temprana llamadas variedades de día corto (SD) o con floración estacional. Esto se debe, principalmente, a cuestiones comerciales y económicas. La producción fresera de la región está destinada en su mayoría a la exportación, a los países del norte de Europa, durante los primeros meses del año, cuando la rentabilidad económica es elevada (**Tabla 3**). Por tanto, al sector fresero le interesa, cada vez más, adelantar la floración y concentrar la producción en estos meses. Para satisfacer las necesidades de precocidad y sincronización de la producción, que los mercados demandan, existen diferentes soluciones (López-Aranda *et al.*, 2008). La primera de ellas, se desarrolla en las propias fincas. Engloban las técnicas propias de un cultivo moderno altamente tecnificado e intensivo, tanto en su labores agrícolas como en el “forzado” del cultivo. La segunda de ellas es la utilización de una amplia y potente (económicamente hablando) infraestructura viverística, localizada en zonas elevadas sobre el nivel del mar (“viveros de altura”) y aisladas de las zonas de cultivo de fresa. Estos “viveros de altura” reúnen las condiciones de termoperíodo, fotoperíodo y aislamiento fitosanitario, necesarios para conseguir una correcta madurez fisiológica de la planta; que promoverá una adecuada diferenciación floral y una equilibrada entrada en producción en los campos de fructificación onubenses. La última estrategia, es la mejora genética varietal encaminada a la obtención de nuevas variedades, que colmen las exigencias de los productores y de los consumidores. Este trabajo es desarrollado por los mejoradores de plantas. Se trata de un proceso largo y para el cual es necesario un amplio conocimiento fenológico, fisiológico y genético de los diferentes cultivares disponibles (López-Aranda *et al.*, 2008).

	Región	Hectáreas Cultivadas	Producción (T)
1º	China	109940	2997504
2º	USA	23549	1360869
3º	México	8496	379464
4º	Turquía	13549	372498
5º	España	8000	312500
6º	Egipto	6029	254921

Tabla 1. Principales países productores de fresa (FAOSTAT 2013)

	Región	Cantidad (T)	Valor (1000 \$)
1º	España	266453	619911
2º	USA	153730	467657
3º	México	107759	209457
4º	Países bajos	53347	346325
5º	Bélgica	43001	171213
6º	Grecia	34119	60419

Tabla 2. Principales países exportadores de fresa (FAOSTAT 2013)

	Región	Cantidad (T)	Valor (1000 \$)
1º	USA	149945	330123
2º	Canadá	123384	351381
3º	Alemania	112108	293697
4º	Francia	92968	219810
5º	Rusia	57174	127129
6º	Reino Unido	46189	183277

Tabla 3. Principales países importadores de fresa (FAOSTAT 2013).

3. Marcadores moleculares.

3.1 Generalidades.

Un marcador genético es una característica del organismo (morfológica, bioquímica o molecular) que exhibe una segregación mendeliana, es polimórfico y fácil de rastrear en cada individuo. Todos los marcadores genéticos ocupan una posición genómica específica dentro de los cromosomas llamadas *loci* (*locus* en singular) y pueden estar ligados a los genes que controlan rasgos de interés, sin formar parte de los mismos, generalmente. Los marcadores genéticos pueden ser clasificados en: (i) marcadores morfológicos (caracteres fenotípicos); (ii) marcadores bioquímicos o isoenzimas y marcadores moleculares (Winter y Kahl, 1995; Jones *et al.*, 1997). Los marcadores morfológicos y bioquímicos son relativamente escasos y presentan variaciones dependiendo de las condiciones ambientales o el estado de desarrollo de la planta. Sin embargo, los marcadores moleculares no se ven influenciados por factores ambientales. Los marcadores moleculares presentan más ventajas (Helentjaris, 1992): (1) su elevado número y su amplia distribución por el genoma posibilita el mapeado de regiones génicas, con una densidad alta de marcadores. (2) Los marcadores moleculares no suelen verse afectados por otros, lo que permite evaluar múltiples marcadores a la vez. (3) Suelen presentar herencia mendeliana simple. (4) Los posibles ensayos de marcadores no son destructivos y (5) las muestras pueden ser almacenadas para un análisis futuro. Por todas estas características, los marcadores moleculares son los marcadores genéticos más utilizados (Winter y Kahl, 1995; de Vienne, 2003).

Los marcadores moleculares presentan múltiples usos (Singh y Singh, 2015), entre los que se encuentran: (1) identificación de especies y/o variedades (fingerprinting); (2) mapeado y clonaje posicional de genes y/o QTLs; (3) identificación de segmentos cromosómicos implicados en la mejora de determinados caracteres; (4) establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies y/o variedades; (5) selección de parentales para hibridación, (6) identificar casos de variación somaclonal; (7) identificación de razas o biotipos de especies patógenas; (8) predicción de efectos heteróticos en cruces y (9) ayuda a la selección asistida por marcadores (MAS). Para poder ser útiles los marcadores moleculares deben reunir, en la medida de lo posible, una serie de características, siendo las más importantes las siguientes (Collard *et al.*, 2005; Singh y Singh, 2015):

- **Alto Polimorfismo:** para que un marcador sea útil, es conveniente que presente un cierto grado de polimorfismo dentro del conjunto de muestras en estudio, ya que

de otro modo no resolvería los problemas de identificación. El caso óptimo es el de muestras que presentan algún marcador específico y que por tanto las identifica frente a otras.

- **Codominancia:** esta característica hace que el fenotipo del marcador posibilite la identificación completa del genotipo, al permitir la distinción entre heterocigosis y la homocigosis.
- **Distribución en el genoma:** interesa que la distribución de los marcadores en el genoma sea lo más amplia y homogénea posible, ya que ello hará que sea más eficaz en la identificación.
- **Comportamiento neutro** frente a la selección natural.
- **Sencillez:** conviene que la metodología empleada en el análisis sea sencilla y rápida, así como económica en su coste.
- **Objetiva:** interesa que los resultados obtenidos no se presten a interpretaciones subjetivas, sino que muestren de modo claro la presencia o ausencia de un determinado marcador.
- **Repetitividad:** interesa obtener los mismos resultados al aplicar una misma metodología, con independencia del analista y del laboratorio donde se realiza el análisis.

Una de las utilidades que presentan los marcadores moleculares, como dijimos anteriormente, es la construcción de mapas genéticos de ligamiento, en los que se dispone el orden lineal y las distancias relativas entre los *loci* de un determinado cromosoma, dentro de cada especie (Paterson, 1996). Los mapas genéticos sirven, por tanto, como marcos de referencia para localizar genes concretos, suelen usarse como puntos de partida en programas de MAS y representan la base para el estudio de la estructura y la evolución de los genomas (Liu, 1998). Además, representan una herramienta muy versátil en la secuenciación completa de genomas tanto de plantas como animales (Spiller *et al.*, 2011).

Los mapas de ligamiento se basan en la tendencia que presentan dos o más *loci*/genes de heredarse juntos, fenómeno llamado *ligamiento*; se acepta que dos o más *loci*/genes presentan *ligamiento* cuando se sitúan relativamente próximos en el mismo cromosoma. Como resultado del entrecruzamiento cromosómico o *recombinación* (*crossing over*, en inglés) durante la meiosis, es posible recuperar distintas combinaciones de *loci*/genes ligados. Por ejemplo, si dos genes heterocigotos (Aa/Bb) se localizan en cromosomas distintos o muy separados dentro de un mismo cromosoma, segregaran independientemente durante la meiosis, por lo que la frecuencia de los cuatro gametos posibles (AB, Ab, aB y ab) será la misma (25 %). Sin embargo, si existe ligamiento entre dos *loci*/genes (por ejemplo entre A y B) o lo que es lo mismo, se encuentran próximos en

el cromosoma, la proporción de gametos se ve alterada y la frecuencia de los gametos recombinantes (Ab y aB, en el ejemplo) disminuye conforme disminuye la distancia entre los *loci*/genes ligados. La *frecuencia de recombinantes* entre dos *loci*/genes ligados es por tanto proporcional a la distancia entre ellos y puede usarse para calcular la *fracción de recombinación* (r) (Singh y Singh, 2015). Para la elaboración de un mapa genético las fracciones de recombinación obtenidas entre pares de marcadores genéticos (presentes en una población de mapeo) son convertidas en distancias genéticas. Cuando las distancias son pequeñas, r se comporta como un buen estimador de las distancias génicas, pero no existe una relación lineal entre r y la distancia génica, debido a los eventos de recombinación múltiple entre *loci*/genes. Si los marcadores genéticos se encuentran dispersos, la *fracción de recombinación* se puede transformar mediante modelos empíricos, llamados *funciones de mapa*, para compensar los eventos de recombinación múltiples. Las *funciones de mapa* convierten la *fracción de recombinantes* en unidades de mapa o centiMorgans (cM). La primera *función de mapa* fue desarrollada por Haldane (Haldane, 1919) y fue modificada posteriormente por Kosambi (Kosambi, 1943). Una vez que se tienen las distancias génicas entre los distintos marcadores, se agrupan estos en distintos grupos de ligamiento. Y por último, el orden que presentan estos marcadores dentro de los distintos grupos de ligamiento, se representan conformando el mapa genético de ligamiento (Singh y Singh, 2015).

3.2 Tipos de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares están basados en el análisis directo de la molécula de ADN y ponen de manifiesto variaciones en la secuencia. Estas variaciones son producidas por diferentes tipos de mutaciones (mutaciones puntuales, sustituciones de bases, deleciones o inserciones) o por errores ocurridos durante la replicación (Paterson, 1996). Según la técnica usada para ponerlos de manifiesto, los marcadores moleculares pueden ser clasificados en: (i) basados en la hibridación a sondas; (ii) basados en la PCR y (iii) basados en el estudio de la secuencia de ADN (Winter y kahl, 1995; Jones, 1997).

3.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

Esta técnica permitió superar algunos de los problemas que plantaba el uso de isoenzimas y fue desarrollada para la construcción de mapas genéticos en humanos (Botstein *et al.*, 1980). Con posterioridad fueron muy usados para la construcción de mapas de ligamiento en cultivos como maíz o tomate (Helentjaris *et al.*, 1986) y también en fresa (Viruel *et al.*, 2002). Se basan en la comparación de los perfiles obtenidos como consecuencia de la hidrólisis del ADN mediante endonucleasas de restricción (Botstein *et al.*, 1980). Los diferentes fragmentos generados por la ruptura del ADN por las

endonucleasas son separados, por tamaño, en geles de agarosa y posteriormente transferidos a un soporte sólido, normalmente membranas de nylon, procedimiento conocido como *Southern blotting*. Sobre este soporte sólido se realiza la hibridación con sondas específicas (*southern hybridization*) y por último se revela el bandeo mediante una radiografía.

Es una técnica robusta, fiable y que permite una determinación completa y clara del genotipo, pudiendo distinguir así heterocigosis de homocigosis (codominancia). En su contra, es una técnica laboriosa y cara, que necesita grandes cantidades de ADN de alta calidad y que precisa de conocimientos previos del ADN para el diseño de las sondas (Singh y Singh, 2015).

3.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

Son unos marcadores obtenidos mediante la amplificación al azar (por PCR) de fragmentos de ADN genómico, utilizando para ello cebadores simples de secuencia arbitraria (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) que hibridan en *loci* repartidos de modo aleatorio por todo el genoma (Williams *et al.*, 1990). Los fragmentos amplificados son separados y visualizados mediante electroforesis. Fueron marcadores muy usados por su rápida detección (mediante PCR), por su abundancia y su bajo coste. Sin embargo su mayor desventaja es que son poco reproducibles y además son marcadores dominantes. Usando estos marcadores se realizó el primer mapa de ligamiento de *F. vesca* (Davis y Yu, 1997) y se indagó en las relaciones evolutivas existentes entre las variedades norteamericanas de *F. × ananassa* (Degani *et al.*, 2001). Actualmente, con el auge de nuevas tecnologías de secuenciación y genotipados más robustos y eficientes, prácticamente han caído en desuso (Singh y Singh, 2015).

3.2.3 Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP).

Esta técnica se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de DNA generados por enzimas de restricción a partir de DNA genómico (Vos *et al.*, 1995). La técnica se realiza en tres pasos. El primer paso consiste en la digestión de 100 – 500 ng de ADN genómico con dos enzimas de restricción. Posteriormente se ligan unos adaptadores específicos, de secuencia conocida, en ambos extremos de los fragmentos de restricción. Una vez unidos los adaptadores se lleva a cabo una amplificación de los mismos mediante cebadores específicos, complementarios a los adaptadores, pero con varios nucleótidos adicionales (llamados *nucleótidos selectivos*) en el extremo 3', de esta forma se limita el número de fragmentos amplificados, ya que se necesita complementariedad con los *nucleótidos selectivos* para que la extensión tenga lugar. Modificando el número y naturaleza de los *nucleótidos selectivos*, se puede alterar el número de fragmentos

amplificados. El grupo de fragmentos amplificados se separa mediante una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida. Por último se revela el gel mediante radiografía, fluorescencia o tinción (normalmente con plata) y se analiza el patrón de bandas obtenido (Vos *et al.*, 1995). Alternativamente y para mayor eficiencia, los marcadores AFLPs pueden ser separados y visualizados en secuenciadores capilares automáticos usando cebadores marcados con fluoróforos. Los marcadores AFLP pueden ser usados para identificación varietal (Degani *et al.*, 2001; Tyrka *et al.*, 2002), mapeo genético, MAS y clonaje de genes. A partir de ellos se obtuvo el primer mapa de ligamiento de la fresa octoploide (Lecerteau-Köhler *et al.*, 2003).

Es una técnica robusta, fiable y altamente reproducible. No necesita grandes cantidades de DNA, aunque este debe ser de alta calidad para poder ser digerido por las enzimas de restricción (Vos *et al.*, 1995). Siguen siendo muy usados en aquellas especies que carecen de un genoma secuenciado de referencia (Singh y Singh, 2015).

3.2.4 Microsatélites o Simple Sequence Repeats (SSR).

Los microsatélites son repeticiones de motivos cortos, 1 – 6 bp de longitud, repetidas en tándem. Se detectan mediante PCR usando cebadores de secuencia única flanqueantes (Tautz, 1989). Están abundante y uniformemente distribuidos por el genoma eucariótico, pudiendo encontrarse tanto en regiones codificantes como no codificantes (Tóth *et al.*, 2000). El nivel de polimorfismo que presentan es muy elevado. Son marcadores codominantes y altamente reproducibles, por ello han sido muy usados en el análisis de pedigrí, identificación de variedades, construcción de mapas genéticos, análisis de QTLs y análisis filogenéticos. Con las recientes tecnologías de secuenciación masiva (Metzker, 2010), el número de Expressed Sequence Tags (ESTs) disponibles en las bases de datos públicas ha aumentado exponencialmente, así como la disponibilidad de la secuencia del genoma de muchas especies, facilitando el diseño de los cebadores necesarios para los microsatélites.

En fresa existen se han publicado numerosos trabajos basados en marcadores SSR, por ejemplo para analizar la influencia de los programas de mejora sobre la diversidad de la fresa cultivada (Gil-Ariza *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 2011), para la construcción de mapas de ligamiento en *F. vesca* (Sargent *et al.*, 2004, 2006, 2008; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011a) y *F. × ananassa* (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008; Isobe *et al.*, 2013; van Dijk *et al.*, 2014) y para la detección de QTLs que controlan la calidad del fruto (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011b; Lecerteau-Köhler *et al.*, 2012; Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2012).

3.2.5 Diversity Array Technology (DArT)

Diversity array technology (DArT) es una técnica de genotipado barata y que proporciona un gran número de datos de manera eficiente. El análisis de DArT se realiza en dos pasos. El primero de ellos consiste en la construcción de un microarray, llamado *matriz de diversidad* (diversity array, en inglés); a continuación se genotipan las distintas muestras/individuos/líneas mediante hibridación de los fragmentos de su genoma con la *matriz de diversidad*. La técnica es similar a los AFLP, pero cambiando el gel de electroforesis por la *matriz de diversidad* (Jaccoud *et al.*, 2001; Kilian *et al.*, 2012). La *matriz de diversidad*, debe contener los fragmentos genómicos polimórficos de la especie de interés. Estos fragmentos polimórficos se obtienen mediante el siguiente procedimiento: (1) aislamiento del ADN de los individuos de la población necesarios para cubrir toda la diversidad. (2) Digestión del ADN de cada individuo (aproximadamente 5 ng) con las enzimas de restricción seleccionadas. (3) Ligación de los adaptadores apropiados en los extremos de los fragmentos obtenidos. (4) Una amplificación selectiva, usando *nucleótidos selectivos*, para reducir la complejidad y el número de los fragmentos amplificados y (5) clonado de los distintos fragmentos amplificados. (6) Cada clon es amplificado individualmente, usando cebadores específicos, y (7) purificado y colocado en el microarray (Jaccoud *et al.*, 2001). Tras el paso (7) obtenemos lo que se conoce como *matriz de descubrimiento* (discovery array, en inglés). Posteriormente se localizan los fragmentos polimórficos presentes en la *matriz de descubrimiento* usando ADN marcado. Este ADN marcado, tiene el mismo origen que el usado para la construcción de la *matriz de descubrimiento* y se trata de la misma forma, se corta con las mismas enzimas de restricción y se amplifica con la misma mezcla de cebadores, pero es marcado con dos colorantes fluorescentes diferentes (fluorescent dye, en inglés). A continuación se seleccionan aquellos puntos de la *matriz de descubrimiento* polimórficos, que serán aquellos que presenten una fluorescencia del mismo color que los colorantes usados (no la mezcla de ambos). Una vez seleccionados los puntos polimórficos en la *matriz de descubrimiento*, se vuelven a clonar y se construye con ellos la *matriz de diversidad* (Jaccoud *et al.*, 2001). Para realizar el genotipado, entre 50 – 100 ng de ADN, de cada muestra/individuo/línea es aislado y fragmentado con el mismo protocolo usado para construir la *matriz de diversidad*. Se corta con las mismas enzimas de restricción, se amplifica con los mismos cebadores, se marca con un colorante adecuado y es hibridado en la *matriz de diversidad*. La señal de hibridación obtenida es analizada mediante herramientas informáticas especiales (como DArTdb, Client Interaction o DArTsoft), presentes en el programa de código abierto LAMP (Singh y Singh, 2015).

Los DArT se utilizan para la caracterización de germoplasma, estudios de diversidad, selección de parentales en programas de mejora y mapeo de genes y/o QTL.

También son muy usados en MAS, ya que la *matriz de diversidad* para una especie se desarrolla una única vez. Existen matrices de genotipado para gran cantidad de cultivos, como: arroz (Jaccoud *et al.*, 2001), cebada (Wenzl *et al.*, 2004), trigo (Akbari *et al.*, 2006), caña de azúcar (Tinker *et al.*, 2009), manzana (Schouten *et al.*, 2012) o *F. × ananassa* (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015). Más recientemente, la tecnología DArT se ha combinado con las nuevas tecnologías de secuenciación masivas lo que ha permitido el desarrollo de plataformas DArTseq que permiten el genotipado eficiente de marcadores DArT y SNPs conjuntamente (Kilian *et al.*, 2012; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015).

3.2.6 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

La variación en un único nucleótido del ADN de varios individuos de una misma especie se conoce como *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs). Los SNPs son los marcadores genéticos más abundantes, llegando a constituir aproximadamente el 90 % de la variabilidad genética presente en cualquier organismo (Mammadov *et al.*, 2012). Un SNP puede presentar cuatro alelos diferentes (uno por cada nucleótido: A, C, T y G) y únicamente es considerado como tal, cuando el alelo menos habitual tiene al menos una frecuencia igual o superior al 1 %. Los SNPs se pueden producir por transiciones (cambios de C por T, o de A por G y viceversa) o transversiones (cambios de A o G por T o C y viceversa), siendo las transiciones más frecuentes que las transversiones. Los SNPs presentan bajos índices de mutación y son fáciles de detectar. Normalmente son más frecuentes en las zonas no codificantes del genoma (ncSNPs). Los SNPs presentes en la zona codificante (cSNPs) pueden alterar la secuencia de algún gen y producir cambios fenotípicos (llamados SNP candidato o funcional) o no producir cambios en la proteína, llamados SNP anónimos. Algunos ncSNPs pueden producir cambios fenotípicos en los individuos, son aquellos que se localizan en los promotores génicos y alteran su función, se les conoce como SNPs promotores (Singh y Singh, 2015).

Todos los SNPs se identifican mediante secuenciación, bien por la secuenciación completa del genoma, bien de una región concreta del ADN, o por la obtención del transcriptoma vía RNA-seq. El gran avance realizado en los últimos años en las técnicas de secuenciación masiva (*Next-Generation DNA Sequencing Methods*, NGS por sus siglas en inglés) ha facilitado y abaratado la búsqueda de SNPs; proporcionando una enorme cantidad de secuencias genómicas y EST, almacenadas en las bases de datos, que pueden ser rastreadas en la búsqueda de nuevos SNPs [trigo (Akhunov *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014); caña de azúcar (García *et al.*, 2013); manzana (Troggio *et al.*, 2013); *F. × ananassa* (Bassil *et al.*, 2015)]. El genotipado de los SNPs en las accesiones o cultivares de interés se suele abordar mediante ensayos de hibridación en arrays. Estas técnicas o estrategias para la detección y genotipado de SNPs requieren de una instrumentación sofisticada y

cara, lo que limita su uso en laboratorios pequeños. Pero por el contrario la mayoría se encuentran comercializados, por ejemplo: **KASP™** (*Kompetitive Allele-Specific PCR*, comercializado por LGC Genomics, UK); **TaqMan OpenArray Genotyping System** de Applied Biosystems, USA; **Illumina GoldenGate SNP Genotyping Platform** o **Affymetrix Axiom® Genome-Wide Arrays** y producen un elevadísimo número de datos, con un rendimiento también elevado (coste por dato) (Singh y Singh, 2015). El rápido avance de las técnicas de *NGS* y *TGS* (*Third-Generation DNA Sequencing Methods*) han permitido el desarrollo de diversos métodos que combinan la identificación y el genotipado de nuevos SNPs. Normalmente estas técnicas constan de un paso previo en el que se reduce el número de secuencias para disminuir la complejidad (y el coste) sin comprometer la calidad del resultado. Estas estrategias pueden comprender: (i) la búsqueda en el genoma completo [por ejemplo: *Genotyping by Sequencing (GBS)*] o (ii) la búsqueda y/o secuenciación de partes específicas del genoma, como puede ser el RNA-seq (Singh y Singh, 2015).

3.3 Análisis de grupos segregantes (Bulk Segregant Analysis, BSA).

El análisis de *Bulk* segregantes (BSA) es una herramienta poderosa para la identificación de marcadores moleculares ligados a un gen de interés en regiones específicas del genoma (Michelmore *et al.*, 1991). Este método implica comparar dos grupos (*pool/bulk*) de muestras de ADN de individuos de una población segregante procedente de un cruce biparental. Dentro de cada grupo, los individuos son idénticos para un rasgo particular o gen de interés pero arbitrario para el resto de caracteres o genes. Estos dos grupos opuestos para un rasgo (presencia-ausencia de estolones en nuestro estudio) se analizan para identificar marcadores que los distinguen. Los marcadores que son polimórficos entre los grupos estarán genéticamente ligados al *locus* determinante del rasgo usado para la construcción de los grupos. Esta técnica permite localizar rápidamente genes que no segregan inicialmente en las poblaciones para generar el mapa genético. Este enfoque se ha usado frecuentemente para etiquetar genes de resistencia a enfermedades en diversos cultivos, como fresa (Haymes *et al.*, 1997) o tomate (Van der Beek *et al.*, 1994).

La combinación de AFLP y BSA permite detectar un gran número de polimorfismos reproducibles y asociados al carácter de interés en un periodo de tiempo relativamente corto (Kepiro y Roose, 2010).

Marcador molecular	Codominante (C) o Dominante (D)	Ventajas	Desventajas
RFLP	C	Robusto Fiable Transferible a través de poblaciones	Laborioso y caro Necesita grandes cantidades de DNA Polimorfismo limitado
RAPD	D	Rápido, simple y económico Necesita pequeñas cantidades de DNA	No transferible Problemas de reproducibilidad
SSR	C	Técnicamente simple Robusto y fiable Transferible entre poblaciones	Requiere información previa Necesita electroforesis en poliacrilamida o sec. capilar
AFLP	D	Múltiples loci Generación de altos niveles de polimorfismo	ADN de alta calidad Metodología complicada. Electroforesis en poliacrilamida o sec. capilar
DArTs	D	Generación de altos niveles de polimorfismo High throughput	Metodología complicada Coste del equipo elevado
SNPs	C	Muy abundantes High throughput	Metodología complicada Coste del equipo elevado

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los marcadores moleculares (adaptado de Collard *et al.*, 2005).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 2:

Estudio de genes reguladores de la inducción floral en *Fragaria × ananassa*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 2: Estudio de genes reguladores de la inducción floral en *Fragaria × ananassa*.

1. Objetivos.

El objetivo general de este capítulo ha sido determinar el papel que juegan genes seleccionados en la inducción y regulación de la floración en la fresa cultivada (*Fragaria × ananassa*).

Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y caracterización de los genes de *Fragaria × ananassa* ortólogos a los genes: *CONSTANS (AtCO)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (AtSOC1)*, *FLOWERING LOCUS D (AtFD)* y *AGAMOUS LIKE-6 (AtAGL6)* de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinación de los niveles de expresión de los genes *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD*, *FaFD2* y *FaAGL6* en distintos órganos/tejidos de *Fragaria × ananassa* cv. Chandler.
- Evaluación del efecto del fotoperiodo en la expresión de los genes *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD*, *FaFD2* y *FaAGL6* en cultivares de fresa que difieren en su respuesta al mismo.
- Análisis del efecto del ritmo circadiano en la expresión de los genes *FaCO*, *FaFD2* y *FaSOC1* en dos cultivares que difieren en su respuesta frente al fotoperiodo, 'Chandler' y 'Selva', bajo condiciones de SD y DL.
- Evaluar el efecto de la sobre-expresión de *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD2* y *FaAGL6* sobre la inducción floral, en particular, y la morfología de la planta, en general, mediante la obtención de plantas transgénicas (*Fragaria × ananassa* cv. Camarosa) que expresan los distintos genes bajo el control del promotor constitutivo 35S.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. Material y Métodos.

2.1 Material Vegetal.

2.1.1 Material vegetal para aislamiento de los genes.

El clonaje de los genes en *F. × ananassa* se hizo sobre tejidos del cultivar de DN 'Selva'. Las plantas fueron multiplicadas vegetativamente mediante estolones a partir del material existente en el Banco de Germoplasma de Fresa ubicado en el Centro IFAPA de Churriana (Málaga) y cultivadas en umbráculo hasta su utilización. Para *FaCO* se usó hoja joven expandida y corona (**Figura 6**) para *FaSOC1*, *FaFD2* y *FaAGL6*. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.2 Material vegetal para estudios de expresión génica en tejidos.

Para la realización de los experimentos de expresión génica se han utilizado plantas de fresa de la especie *Fragaria × ananassa* de los cultivares 'Chandler', 'Parker', 'Selva' y 'Fern'. Las plantas, multiplicadas mediante estolones, provenían del Banco de Germoplasma de Fresa ubicado en el Centro IFAPA de Churriana (Málaga) y fueron crecidas en un invernadero abierto (umbráculo) intentando reproducir las condiciones de cultivo en campo. El riego y abonado de las plantas se realizó de manera automática mediante un sistema de goteo. Las plagas y enfermedades fueron controladas por personal especializado, mediante tratamientos fitosanitarios periódicos. Las plantas se limpiaron periódicamente de hojas, frutos y estolones en mal estado para mantener la salud de las mismas durante el desarrollo de los experimentos.

Los experimentos de expresión génica se realizaron sobre hoja, raíz, corona y flor cerrada; así como en frutos con distinto estadio de madurez: verde, blanco y rojo. Características de los tejidos usados en el estudio:

- Hoja, joven expandida procedente de la roseta central de la planta. Sin síntomas de enfermedad, sin peciolo y sin suciedad (**Figura 6D-2**)
- Raíz, joven completamente desprovista de sustrato y sin síntomas aparentes de senescencia (**Figura 6B-1 y D-1**).
- Corona. Consideramos corona a la parte del tallo de la fresa obtenida al desprender todas las hojas y raíces de la roseta central, quedándonos únicamente con un tejido blanco; donde se localizan el SAM y la mayoría de las yemas laterales que darán lugar a inflorescencias, estolones y coronas laterales (**Figura 6C-2 y D-3**).

- Flor cerrada. Estadio de desarrollo floral en el que todavía no son visibles los pétalos, están formados pero encerrados aún por los sépalos, justo antes de la antesis (**Figura 6E-1**).
- Tradicionalmente se han establecido cuatro estadios de maduración en base a la pigmentación externa del fruto de fresa: verde, blanco, intermedio y rojo (**Figura 6E-4, 5, 6 y 7**; respectivamente). La maduración del fruto tarda aproximadamente 40 días (dependiendo de las condiciones ambientales del cultivo; Perkins-Veazie, 1995). El fruto blanco ocurre aproximadamente 21 días tras la antesis y el rojo entre los días 30 a 40.

La toma de muestras se realizó en tres fechas distintas:

- Condiciones de día corto (SD) → el muestreo tuvo lugar el día 21/12/2012, coincidiendo con el solsticio de invierno, día más corto del año. Se recolectaron hojas, raíces y coronas de doce plantas por cultivar, divididas en tres réplicas biológicas independientes con cuatro plantas cada una. El muestreo de 'Fern' tuvo lugar a las 8:30 horas de la mañana. 'Parker' se muestreo a continuación, sobre las 10:30 horas. A continuación se muestreo 'Chandler' a las 12:00 horas y por ultimo 'Selva' aproximadamente a las 13:30 horas de la tarde.
- Condiciones de día largo (LD) → el muestreo tuvo lugar el día 21/06/2013, coincidiendo con el solsticio de verano, día más largo del año. Se siguió la misma metodología que en el muestreo anterior, respetando el orden de recolección anterior.

Durante la primavera se recolectaron flor cerrada y frutos según se iban alcanzando los estadios necesarios en cada cultivar. Se volvieron a realizar tres réplicas biológicas compuestas al menos con cinco flores o frutos de tres plantas distintas, pero únicamente sobre dos cultivares: 'Chandler' y 'Selva'.

En los tres casos anteriores, los tejidos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y conservados a -80°C , para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

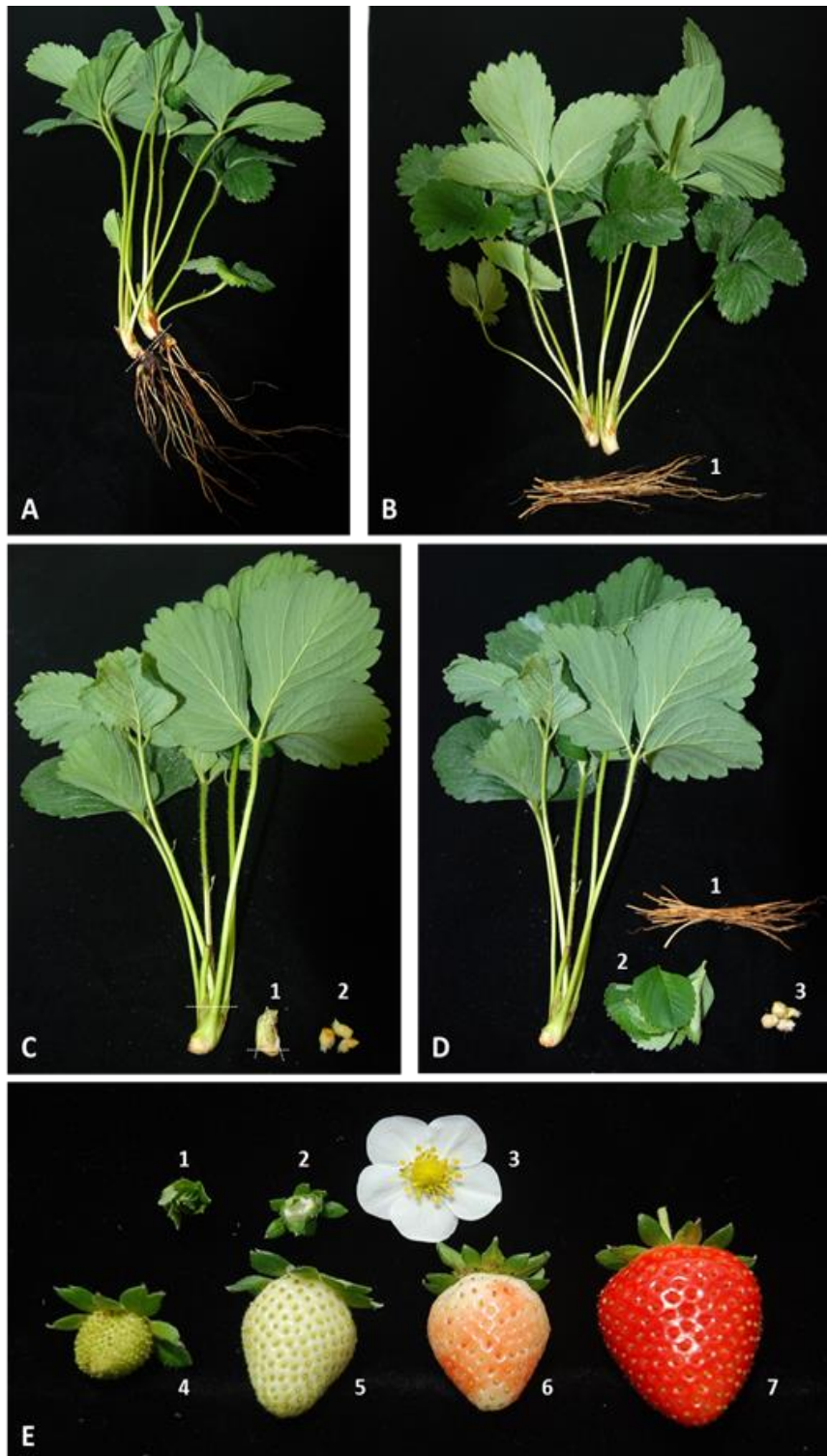


Figura 6. Tejidos muestreados. (A) Imagen de planta entera. (B) Imagen de planta con raíces separadas del tallo (1). (C) Imagen de planta, tallo desprovisto de hojas (1) y coronas obtenidas al limpiar el tallo de las capas de restos de hoja que envuelven a SAM y meristemos laterales (2). (D) Imagen representativa de tejidos vegetativos usados en el estudio, raíz (1), hoja (2) y coronas (3). (E) Imagen ilustrativa de los tejidos reproductivos usados en el estudio, (1) Flor cerrada, (2) Flor semiabierta, (3) Flor abierta, (4) Fruto verde, (5) Fruto blanco, (6) Fruto “turning” y (7) Fruto rojo. Líneas discontinuas, zonas de corte y separación (o limpieza) de tejidos.

2.1.3 Recolección de muestras para el control circadiano de la floración.

Los experimentos para la determinación del control circadiano se realizaron sobre hoja de dos cultivares diferentes: 'Chandler' y 'Selva'. Los muestreos se repitieron en condiciones de día corto (SD) y día largo (LD). El muestreo de SD tuvo lugar el día 22/12/2013. El primer muestreo se realizó a las 08:00 horas de la mañana (justo al amanecer). Los muestreos se repitieron cada cuatro horas hasta completar un ciclo de 24 horas (7 puntos de muestreo). El muestreo de LD se realizó el día 23/06/2014. El primer muestreo tuvo lugar de nuevo justo al amanecer (07:00 horas) y se fue repitiendo cada cuatro horas hasta completar un ciclo de 24 horas. En cada estación de muestreo se realizaron tres réplicas biológicas independientes, con hojas de al menos tres plantas diferentes. Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su maceración y procesado.

2.2 Aislamiento de RNA total, tratamiento con DNasa I y síntesis de cDNA.

El método empleado para la extracción de ARN total de tejidos de fresa se basa en el protocolo descrito por Manning, 1991.

Previo a la extracción se maceró en un mortero el tejido congelado en nitrógeno líquido hasta reducirlo a un polvo fino, con cuidado de que no se descongelara, se pasó a un eppendorf estéril 0,2 g del macerado (polvo fino). Se añadió 900 μL de tampón de extracción [Tris-HCl 0,2 M, EDTA 10mM, pH 7,6 ajustado con ácido bórico (autoclavado)], 45 μL de SDS 10% (5% v/v) y 18 μL de β -mercaptoetanol (2% v/v). Se homogenizó con vortex y se añadió 900 μL de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se mezcló con vortex las dos fases vigorosamente, mientras se incubaba a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante y se completó hasta un 1 mL con agua estéril, añadiendo la cantidad de acetato sódico (3M, pH 4,5) necesaria para una concentración final de 80 mM de sodio. Se mezcló y se le añadió 0,4 volúmenes de 2-butoxi-etanol (2-BE). Se mezcló mediante inversión y se incubó en hielo durante 30 min. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó el sobrenadante y se añadió 0,6 volúmenes de 2-BE, se mezcló mediante inversión y se incubó durante una hora. Se centrifugó 20 min a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y se volvió a repetir la precipitación con 2-BE. Se lavó el pellet resultante con 700 μL de etanol (70%) durante 5 min. Se retiró el etanol y se dejó secar. Se resuspendió el pellet en 500 μL de agua estéril y se le añadió 1/3 volumen de LiCl 12M y se dejó incubando toda la noche (overnight) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó 30 min a 14000 rpm y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 700 μL de etanol (70%). Se volvió a centrifugar 10 min a 14000 rpm y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 μL de agua estéril. La concentración de ARN se cuantificó por

espectrofotometría, midiendo a 260 nanómetros (NanoDrop ND-1000; <http://www.NanoDrop.com>), se comprobó la calidad del mismo mediante dos ratios de absorbancia (260/230 y 260/280) y mediante su visualización en gel de agarosa al 1%.

Para eliminar cualquier resto de ADN aislado junto con el ARN, se sometió a las muestras a un tratamiento con la enzima DNasa I, Thermo Scientific; siguiendo las instrucciones del fabricante.

La retrotranscripción se llevó a cabo partiendo de un 1 µg total de ARN usando el kit de síntesis de cDNA iScript™ de Bio-Rad (<http://www.bio-rad.com>) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para aplicaciones posteriores como qRT-PCR, el cDNA se diluyó 1:10.

2.3 Clonaje de genes en cultivar ‘Selva’.

Para el clonaje de los genes *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD2* y *FaAGL6* de *F. × ananassa*, se realizó una búsqueda mediante BLAST sobre el genoma de *F. vesca* (<http://www.strawberrygenome.org>; Shulaev *et al.*, 2011) y en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando las secuencias de cada gen de *Arabidopsis* [*AtCO* (TAIR ID: AT5G15840), *AtSOC1* (TAIR ID: AT2G54660), *AtFD* (TAIR ID: AT4G35900) y *AtAGL6* (TAIR ID: AT2G45650), respectivamente]. Sobre las secuencias de *F. vesca* con mayor homología obtenidas, se diseñaron cebadores específicos para amplificar el ORF, desde el ATG al codón stop (Tabla 5).

Gen	Nombre	Secuencia	Referencia
<i>FaCO</i>	F_COfull_Sal I	AG TCGAC ATGTTGAAAGAGGAGAGCAA	Gene04172- v1.0-hybrid
	R_COfull_Xba I	AT CTAGA CTAGTACGAAGGAACAATGC	
<i>FaSOC1</i>	F_SOC1full_Sal I	AG TCGAC ATGGTGAGAGGCAAAACC	Gene19425- v1.0-hybrid
	R_SOC1full_Xba I	AT CTAGA CTAGTGCTTCGATCTCCTTT	
<i>FaFD2</i>	F_FDfull_Sal I	AG TCGAC ATGACGATGGAGGATGTGTG	NCBI EX675574
	R_FDfull_Xba I	AT CTAGA CTACATAGAGTGTGCCCTTT	
<i>FaAGL6</i>	F_AGL6full_Sal I	AG TCGAC ATGGGGAGGGGAAGAGTGGA	Gene19428- v1.0-hybrid
	R_AGL6full_Xba I	AT CTAGA TCAAAGCACCCATCCTTGGA	

Tabla 5. Nombre y secuencia de los cebadores usados para el clonaje. En rojo negrita, secuencia de las enzimas de corte, Sal I (en cebador directo F) y Xba I (en cebador reverso R).

Sobre una dilución 1:10 del cDNA y usando como cebadores específicos de cada gen, se realizó una PCR con una polimerasa de alta fidelidad (Exact polymerase, 5-Prime; <http://www.5prime.com>), usando el siguiente programa:

95 °C	30 seg	1 ciclo
95 °C	30 seg	35
60 °C		ciclos
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	1 ciclo

Los productos resultantes de la PCR de alta fidelidad fueron separados en un gel de agarosa (0,8%) y posteriormente se purificaron las bandas resultantes mediante el Kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification (Favorgen Biotech Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados, se ligaron junto con el vector pGemT-easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Por último, se usaron 2 µL de la reacción de ligación para transformar, mediante choque térmico, células competentes de *E. coli* DH5α.

2.4 Protocolo de transformación de células competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico.

Se pusieron en contacto 150 µL de la suspensión de células competentes de la cepa DH5α (descongeladas en hielo) junto con 2 µL de la reacción de la ligación anterior. Se incubó durante 30 min en hielo. Tras la incubación se aplicó un choque térmico de 90 segundos a 42 °C. Se dejaron incubando otros dos minutos en hielo. Se añadieron 500 µL de medio LB líquido y se incubó, en agitación, durante una hora a 37 °C. Finalizada la incubación, se sembraron 100 µL de la suspensión celular en una placa con medio LB-agar (sólido) suplementada con ampicilina (100 µg/mL) y XGal (40 µg/mL). Se dejó crecer el cultivo bacteriano durante la noche a 37 °C y se seleccionaron colonias positivas de color blanco.

2.5 Minipreparación de plásmido mediante lisis alcalina.

Este método fue usado para la extracción de ADN plasmídico tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens*.

Para la extracción de ADN plasmídico (minipreparación) de las colonias candidatas transformadas (positivas), se inocularon a partir de cada colonia 7 mL de medio LB comercial (Pronadisa) suplementado con el antibiótico adecuado y se dejó crecer en agitación toda la noche. Tras este periodo se centrifugaron 1,5 mL del cultivo a 6000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. Se descartó el sobrenadante (esto se repite dos veces en el mismo tubo, para elevar el número de células). El precipitado de células se resuspendió en 100 µL de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de EDTA pH 8) más 3 µL de RNasa (10 µg/mL) y se mezcló mediante inversión. Se añadieron 100 µL de la Solución II (0,2 M NaOH, 1% SDS, preparada en el momento) y se mezcló por

inversión. Por último se añadieron 150 μ L de la Solución III (60 mL acetato potásico 5 M, 11,5 mL de ácido acético y 28,5 mL de agua destilada), se mezcló de nuevo por inversión. Se centrifugó durante 7 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante a un nuevo tubo, donde se añadió 200 μ L de isopropanol a temperatura ambiente y se incubó durante 5 min. El ADN se precipitó por centrifugación durante 7 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó 5 min a 7000 rpm y se retiró el sobrenadante con cuidado. Se dejó secar el precipitado hasta que todo el etanol se evaporó. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 μ L de agua destilada.

2.6 Experimentos de expresión génica.

Los estudios de expresión génica se realizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) usando como sonda el intercalante fluorescente SYBRGreen I y usando un termociclador iQ5 real-time PCR detection system (Bio-RAD). Las reacciones se llevaron a cabo sobre tres síntesis independientes de cDNA (procedentes de las 3 réplicas biológicas) y realizando tres réplicas técnicas por cada muestra. Como gen normalizador de la cantidad de ARN se empleó la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*FaGADPH*, Salvatierra *et al.*, 2010). La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante el método de comparación de C_T (Pfaffl, 2001). Los cebadores usados para cada gen se describen en la **Tabla 6**.

Gen	Nombre	Secuencia	TM	Tamaño
<i>FaCO</i>	RT-FaCO1-F	CTCCGGCTGTCAGATAATGG	60 °C	119 bp
	RT-FaCO1-R	AGGAAGCAGCCTCATCTTCG		
<i>FaSoc1</i>	RT-FaSoc1-F	CCAAGCCAATAACAAAGTTGC	60 °C	118 bp
	RT-FaSoc1-R	TCCAATAGTTTCCGTTTCG		
<i>FaFD</i>	RT-FaFD-F	TCTTGGAAGCCAATCTTCTCC	60 °C	112 bp
	RT-FaFD-R	ATCTCCTCCTCCGAAGTTGC		
<i>FaFD2</i>	RT-FaFD2.3-F	CAAGAAAAGGGCCGTAGAGG	63 °C	181 bp
	RT-FaFD2.3-R	TTGCTGCATTTTGAGTCTGG		
<i>FaAGL6</i>	RT-FaAGL6.2-F	AGCTTGAGACCTTAACCTGC	63 °C	196 bp
	RT-FaAGL6.2-R	GCAGCCACATAGTGCTGGTA		
<i>FaGADPH</i>	RT-GADPH-F	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	60 °C	132 bp
	RT-GADPH-R	AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG		

Tabla 6. Nombre y secuencia de los cebadores usados en los estudios de expresión génica. TM, temperatura de anillamiento usada. En la última columna se indica el tamaño en pares de bases del amplicón obtenido mediante cada cebador.

2.7 Transformación estable de fresa (*Fragaria × ananassa*).

2.7.1 Construcción de los vectores de sobre-expresión.

Los marcos abiertos de lectura (ORF) de *FaCO*, *FaSOC1*, *FaFD2* y *FaAGL6* fueron clonados a partir de cDNA usando los cebadores de la **Tabla 5** (ver Material y Métodos 2.3). Posteriormente estos genes fueron subclonados en el vector binario pBIN19 modificado (Van Engelen *et al.*, 1995) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMv35S*). En los cuatro casos se procedió de la misma manera. Cada gen se ligó entre los sitios de restricción Sal I (extremo 5') y Xba I (extremo 3') presentes en los vectores de clonaje de los genes y en el MCS (multiple cloning site) del vector binario. Una vez ligado cada gen al vector binario se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico y se sembraron en medio LB-agar suplementado con Kanamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y XGal (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se confirmó la presencia del promotor *CaMv35S* junto con el inserto en las colonias positivas, mediante PCR. Para ello se usó el cebador 5'-TCATTCATTTGGAGAGGACA (complementario a la región final del promotor 35S) y como cebador 3' se usaron los cebadores reversos específicos de cada gen usados para el clonaje (**Tabla 5**). Por último se transformó *A. tumefaciens* cepa LB4404 con el vector binario mediante electroporación.

2.7.2 Transformación de bacterias por electroporación.

En una cubeta de electroporación se puso en contacto 100 μL de células competentes de *A. tumefaciens* cepa LB4404 con 3 μL de plásmido aislado. Se dio un impulso de electroporación (2,5 KV, 25 μF y 400 Ω) durante cinco segundos. Una vez dado el impulso se añadió un mL de medio LB líquido y se incubó en agitación durante una hora a 28 °C. Se sembró 100 μL del cultivo resultante en placas de medio LB-agar suplementadas con kanamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estreptomomicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y rifampicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.7.3 Material vegetal.

Para la transformación genética se usó un stock de plantas *in vitro* de *F. × ananassa* cv. Camarosa. El stock de 'Camarosa' fue crecido y multiplicado mediante sucesivos subcultivos hasta alcanzar el volumen de tejido necesario para la transformación. El medio de cultivo usado para la multiplicación del stock fue el medio N₃₀K (**Tabla 7**), modificación del medio MS (Murashige y Skoog) para el cultivo *in vitro* de *F. × ananassa* (Barceló *et al.*, 1998), suplementado con Kinetina (4,76 mg/L), fitohormona que promueve la multiplicación vegetativa del material. Tanto el stock de plantas de fresa como los explantos durante la transformación se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de LD consistente en 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura de la cámara se mantuvo entre un mínimo de 23 °C y un máximo de 25 °C. La intensidad lumínica

fue de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes (Sylvania GroLux F40; Sylvania, Madrid).

2.7.4 Transformación de fresa (*Fragaria × ananassa*).

Para la transformación de fresa se siguió el método propuesto por El Mansouri *et al.*, 1997. Se partió de discos de hoja (stock 'Camarosa'), que al ponerse en contacto con las fitohormonas adecuadas, se convierten en plántulas completas a través de un mecanismo de organogénesis indirecta. El protocolo de transformación consistió en los siguientes pasos:

- 1. Fase de Pre-cultivo.** Partiendo del stock de 'Camarosa' se cortaron discos de hoja a partir de plantas de fresa con 15-20 días desde el último subcultivo. Los explantos se seleccionaron de la parte central de la hoja, más próxima a la inserción de peciolo, por su mayor capacidad regenerativa y con un tamaño aproximado de 4x4 milímetros. Se prepararon entre 170 y 200 explantos por transformación, entre 100 y 120 para el control de transformación (explantos transformados con la construcción *35S:GUS*) y otros 100 como controles: 50 control negativo (con antibiótico) y 50 control positivo (sin antibiótico). Los explantos se colocaron en placas de Petri con la cara adaxial en contacto con el medio de regeneración (N_{30}K suplementado con IBA y BA; **Tabla 7**) y se mantuvieron durante 9 días en oscuridad en una cámara de cultivo. Con el pre-cultivo se consigue inducir la organogénesis antes del co-cultivo con *A. tumefaciens*.
- 2. Preparación del cultivo de *A. tumefaciens*.** La bacteria transformada con el vector binario de interés se inoculó en 7 mL de medio LB líquido pH 7 suplementado con Kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y estreptomina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se dejó crecer durante 24 horas en agitación a 28 °C y posteriormente se inocularon 200 μL del cultivo en 50 mL de LB líquido pH 5 suplementado con Kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estreptomina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y acetosiringona (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se dejó crecer en agitación a 28 °C, durante un mínimo de 24 horas antes del co-cultivo, hasta que alcanzó una densidad óptica (OD) entre 2 y 2,5 medida a 600 nm. Al añadir acetosiringona y rebajar el pH del medio se consigue aumentar la virulencia del *Agrobacterium tumefaciens*, aunque este crece más despacio.
- 3. Infección y co-cultivo de los explantos.** Una vez el cultivo de *A. tumefaciens* (pH 5) alcanza una densidad óptica (OD) entre 2 y 2,5 medida a 600 nm. Se realizaron diluciones usando 5 mL del cultivo bacteriano en 45 mL de agua estéril, en tubos falcón estériles de 50 mL (OD de la dilución de 0,2). En estos tubos falcón se introdujeron aproximadamente 50 explantos de hoja por tubo que se incubaron (*A. tumefaciens* y explantos) durante 15 a 20 min, agitando de vez en cuando para mejorar la infección. Transcurrido el tiempo de incubación se secaron los explantos

en papel de filtro estéril, retirando el exceso de cultivo bacteriano, y se volvieron a colocar de nuevo en las placas con medio de regeneración. Se dejó en oscuridad a 25 °C durante dos días (fase de co-cultivo). Todo el proceso se realizó en cabinas de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, para evitar contaminaciones.

4. **Fase de Selección.** Tras el co-cultivo de los explantos con la solución de *A. tumefaciens*, se transfirieron los explantos a placas Petri con medio de regeneración nuevo suplementado con kanamicina (25 µg/mL), que permite seleccionar aquellas células vegetales que han incorporado el T-DNA, y carbenicilina (500 µg/mL) para evitar el crecimiento bacteriano. Se volvieron a cultivar en oscuridad a 25 °C durante tres días más. Todo el proceso se realizó en cabinas de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, para evitar contaminaciones.
5. **Paso a luz y subcultivos periódicos.** Transcurridos tres días en medio de selección en oscuridad, los explantos se pasaron a luz (40 µmol.m⁻².s⁻¹) de irradiancia en una cámara de cultivo a 25 °C. Los explantos se subcultivaron cada cuatro o cinco semanas en medio de regeneración fresco, suplementado con kanamicina (25 µg/mL) y carbenicilina (500 µg/mL). En el cuarto o quinto subcultivo, si no ha aparecido crecimiento visible del *A. tumefaciens*, se puede reducir la concentración de carbenicilina en el medio de regeneración a 250 µg/mL para facilitar la regeneración celular y la aparición de callos.
6. **Aislamiento de plántulas de fresa.** Los tallos regenerados se aislaron del callo y se pasaron a tubos de ensayo con medio de multiplicación fresco suplementado con kanamicina (25 µg/mL) y carbenicilina (250 µg/mL). Es importante no aislar más de un explanto por callo, a no ser que se encuentren muy separados en el mismo para asegurar la identificación de transformantes independientes. Las plántulas aisladas (y rotuladas en frascos independientes) se subcultivaron cada 4-5 semanas. Gracias a la kinetina del medio de multiplicación fue posible multiplicar cada plántula o clon (línea independiente), para fijar la línea y obtener material suficiente para la extracción de DNA genómico, necesario para la detección del transgen mediante PCR.

Medio N30K		
Sales minerales	NH ₄ NO ₃ (stock 165 g/L)	2,90 mL
	KNO ₃ (stock 190 g/L)	6,90 mL
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (stock 37 g/L)	6,65 mL
	KH ₂ PO ₄ (stock 17 g/L)	8 mL
	NaFe-EDTA (stock ①)	10 mL
	Micronutrientes (stock ②)	10 mL
	Ca(NO ₃)·4H ₂ O (stock 118 g/L)	5 mL
	KCl (stock 37,2 g/L)	2 mL
Compuestos orgánicos	Sacarosa	20 g
	Vitaminas (stock ③)	10 mL
	Mio-inositol	100 mg
	Agar	7 g
Hormonas	IBA (Auxinas) (stock 0,1 g/L)*	5 mL
	BA (Citoquinina) (stock 0,1 g/L)*	20 mL
	Kinetina (Citoquinina) (stock 0,1 g/L)**	4,76 mL
Cantidades calculadas para 1 L de medio Ajustar pH a 5,74		
Na ₂ EDTA ①	Na ₂ EDTA (Titriplex)	3,7240 g/L
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,7870 g/L
Micronutrientes ②	MnSO ₄ · H ₂ O	1,6900 g/L
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,8600 g/L
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0025 g/L
	KI	0,0830 g/L
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,0025 g/L
	H ₃ BO ₃	0,6200 g/L
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0250 g/L
Vitaminas ③	Biotina	0,0050 g/L
	Ácido fólico	0,0500 g/L
	Glicina	0,2000 g/L
	Thiamina · HCl	0,0500 g/L
	Piridoxina · HCl	0,0500 g/L
	Ácido nicotínico	0,5000 g/L

Tabla 7. Composición del medio N₃₀K. * Fitohormonas presentes en el medio N₃₀K para regeneración. ** Fitohormona presente en el medio N₃₀K para multiplicación.

2.7.5 Extracción de ADN genómico de fresa.

Para la extracción de ADN genómico de fresa se utilizó una modificación del método de extracción de ADN con CTAB descrito en Doyle, 1990.

Se partió de 0,13 gramos de tejido macerado en nitrógeno líquido. Antes de que se descongelase se añadió 600 µL de tampón de extracción con CTAB (**Tabla 8**) con un 0,5% de βmercaptoetanol añadido inmediatamente antes. Se homogenizó la mezcla en vortex y se incubó durante 30 min a 65 °C. Se añadió 600 µL de coloroformo:alcohol isoamílico (24:1)

y se mezcló en vortex hasta obtener una emulsión blanquecina. Se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Se volvió a centrifugar a 11000 rpm durante 10 min a 4 °C. En caso de observar precipitado se repite la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico una tercera vez. En caso contrario, se continua con la extracción añadiendo 250 µL (2/3 del volumen) de isopropanol y se agitó suavemente hasta que se observó un precipitado (ADN). En caso de no ser visible, se prolonga la incubación a –20 °C durante 30 min más. A continuación el ADN se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 5 min más y se eliminó el sobrenadante. El *pellet* se dejó secando durante 10-30 min a temperatura ambiente. Por último se resuspendió el *pellet* en agua estéril, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se almacenó cada extracción de ADN a –20 °C.

Tampón de extracción con CTAB	
CTAB	10 g
NaCl 5 M	150 mL
EDTA 0,5 M	20 mL
TRIS HCl 1 M pH 8	50 mL
Polivinil polipirrolidona (PVPP-40)	10 g
Volumen final 500 mL	

Tabla 8. Composición tampón de extracción con CTAB, usado para el aislamiento de ADN genómico.

2.7.6 Condiciones de aclimatación y crecimiento de las plantas transgénicas en invernadero de confinamiento.

Las líneas transgénicas obtenidas y multiplicadas *in vitro* necesitan de un periodo de aclimatación, en las que se “endurecen” para soportar las condiciones ambientales del invernadero, muy diferentes y adversas al crecimiento *in vitro*. El método seguido para la aclimatación se basa en una modificación del descrito por López-Aranda *et al.*, 1994. En nuestro caso, se aclimataron 10 líneas transgénicas por construcción (*35S:FaCO*, *35S:FaSOC1*, *35S:FaFD2* y *35S:FaAGL6*) más 3 líneas control *35S:GUS* (que se denominaron P_{gus1}, 2 y 3).

El proceso completo duró aproximadamente 60 días, variando según la respuesta de las plantas al mismo y las condiciones ambientales. En primer lugar se colocaron las plántulas en unos alveolos con sustrato (turba con vermiculita) y se introdujeron en un túnel completamente cerrado con un 90% de humedad, durante dos semanas. Pasadas dos semanas, se trasladaron a un túnel de apertura progresiva, donde se tuvieron durante una semana más. Posteriormente se colocaron en un túnel completamente abierto durante una

semana. Pasado el primer mes de aclimatación, se plantaron las líneas en macetas pequeñas (9 cm de diámetro) y se dejaron en umbráculo entre 20 y 30 días.

Transcurrida la necesaria aclimatación, las líneas transgénicas aclimatadas se plantaron en las macetas definitivas (21 cm de diámetro, rellenas con una mezcla de turba y arena en proporción 7:3 como sustrato) en las que crecieron durante el desarrollo de todo el experimento.

Tanto la aclimatación y la vida de las líneas se desarrolla en un invernadero especial, de confinamiento, situado en el IFAPA – Centro de Churriana (Málaga) cumpliendo con todas las normas legales prescritas para este tipo de organismos modificados genéticamente. La manipulación, control y seguimiento se realizó por personal técnico del propio centro. Los residuos orgánicos generados por las líneas (hojas, frutos, etc., inclusive el sustrato desechado) fueron esterilizados antes de su eliminación.

2.8 Análisis bioinformático de las secuencias.

El peso molecular teórico y el punto isoeléctrico de la secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuenciación de los genes clonados sobre *F. × ananassa* cv. Selva se calcularon mediante el programa PeptideMass (<http://us.exoasy.org/tools/peptide-mass.html>). Las secuencias proteicas fueron alineadas usando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y el alineamiento resultante modificado con GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility versión 2.7; Nicholas y Nicholas, 1997). Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) usando el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Bootstrap calculado a partir de 1000 réplicas.

2.9 Análisis estadísticos de los datos.

En los estudios de expresión génica mediante qRT-PCR se analizaron al menos dos réplicas biológicas (Set1, Set2 y Set3) por cada muestra y tres réplicas técnicas por cada Set analizado (en todos los casos). Posteriormente, se analizaron las posibles diferencias estadísticas entre las muestras mediante ANOVA de dos vías y el test de comparaciones múltiples (Post-Hoc) LSD de Fisher, excepto cuando la expresión se analiza en un único tejido (genes *FaFD* y *FaAGL6*), donde usamos un *t-test* de Welch.

Las diferencias existentes entre los caracteres medidos a las diferentes líneas transgénicas (inicio de floración, número de flores, inicio de estolonado, longitud de la planta, etc.) y los respectivos controles (Pgus2, Pgus3 y 'Camarosa' Wild type) se analizaron mediante ANOVA y un test de comparaciones múltiples de Dunnett. La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de análisis de la normalidad de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad (igualdad de varianzas) se comprobó mediante el test Bartlett.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. Resultados.

3.1 Caracterización del gen *CONSTANS (CO)* en *Fragaria × ananassa*

3.1.1 Identificación del gen *FaCO* de la fresa cultivada.

El gen *CONSTANS (CO)* de *Arabidopsis* presenta varios dominios característicos de la familia de factores de transcripción (TF) *CONSTANS-like (COL)* (**Figura 7**). En el extremo amino terminal existen dos motivos B-box en tándem, con sus respectivos dedos de zinc, formados por cuatro residuos de cisteína con una estructura conservada (C-X2-C-X16-C-X2-C) en cada uno. En el extremo carboxilo terminal nos encontramos con el dominio CCT (*CONSTANS, CONSTANS-like, TIMING OF CAB EXPRESSION 1*), con una longitud aproximada de 45 aminoácidos (aa), muy conservado en angiospermas. Justo en el extremo amino terminal se encuentra otro motivo presente en *AtCO* y *AtCOL1-5* de estructura muy conservada: G-I/V-V-P-S/T-F (Griffiths *et al.* 2003).

Con el objetivo de identificar el gen ortólogo en la fresa cultivada, se realizó primero una búsqueda en la secuencia del genoma disponible de *F. vesca* (<http://www.strawberrygenome.org>). Esta búsqueda detectó la presencia de tres genes con similitud al gen *AtCO* de *Arabidopsis*. Los cebadores para el clonado de *FaCO*, sobre el 'Selva', se diseñaron a partir de la secuencia de *gene04172-v1.0-hybrid* de *F. vesca*, ya que fue la más parecida a *AtCO*. El gen clonado *FaCO* presentó un ORF de 1155 pares de bases (bp) de longitud, el cual puede codificar para una proteína de 384 aa, con un peso teórico de 42,36 kDa y un punto isoeléctrico (PI) deducido de 5,16. La secuencia aminoacídica predicha para *FaCO* muestra un elevado nivel de conservación con *AtCO*, así como con proteínas CO de otras especies de angiospermas, tanto leñosas como herbáceas, presentes en las bases de datos (**Figura 7**). Las regiones más conservadas se corresponden con los dominios CCT y ambos motivos B-box, así como el motivo propio de la familia COL. Mediante análisis realizados sobre los mutantes de CO en *Arabidopsis*, se ha conseguido identificar los residuos esenciales para la funcionalidad de la proteína (Robson *et al.* 2001). En *FaCO*, estos residuos esenciales se encuentran conservados (**Figura 7**). La región central de la proteína presentó la mayor divergencia, aun así se observan cuatro regiones (M1 a M4) conservadas entre especies y en *FaCO* (**Figura 7**). *FaCO* presentó el porcentaje de identidad más elevado con las proteínas de otras *Rosaceas*: *F. vesca* (97%, *Fv*gene04172) y *P. persica* (84,6%, *Ppe007007*). Sin embargo, también conserva alta similitud con proteínas de especies más alejadas, presentando un 76%, 75% y 61% de identidad con *V. vinifera* (ID: CU459226), *P. deltoides* (ID: AY515150) y *Arabidopsis* (AT5G15840), respectivamente. Como era esperable, *FaCO* presentó un porcentaje de similitud sensiblemente inferior 54,7 % con *OsCO* de la especie monocotiledónea *Oryza sativa* (ID: AB041840).

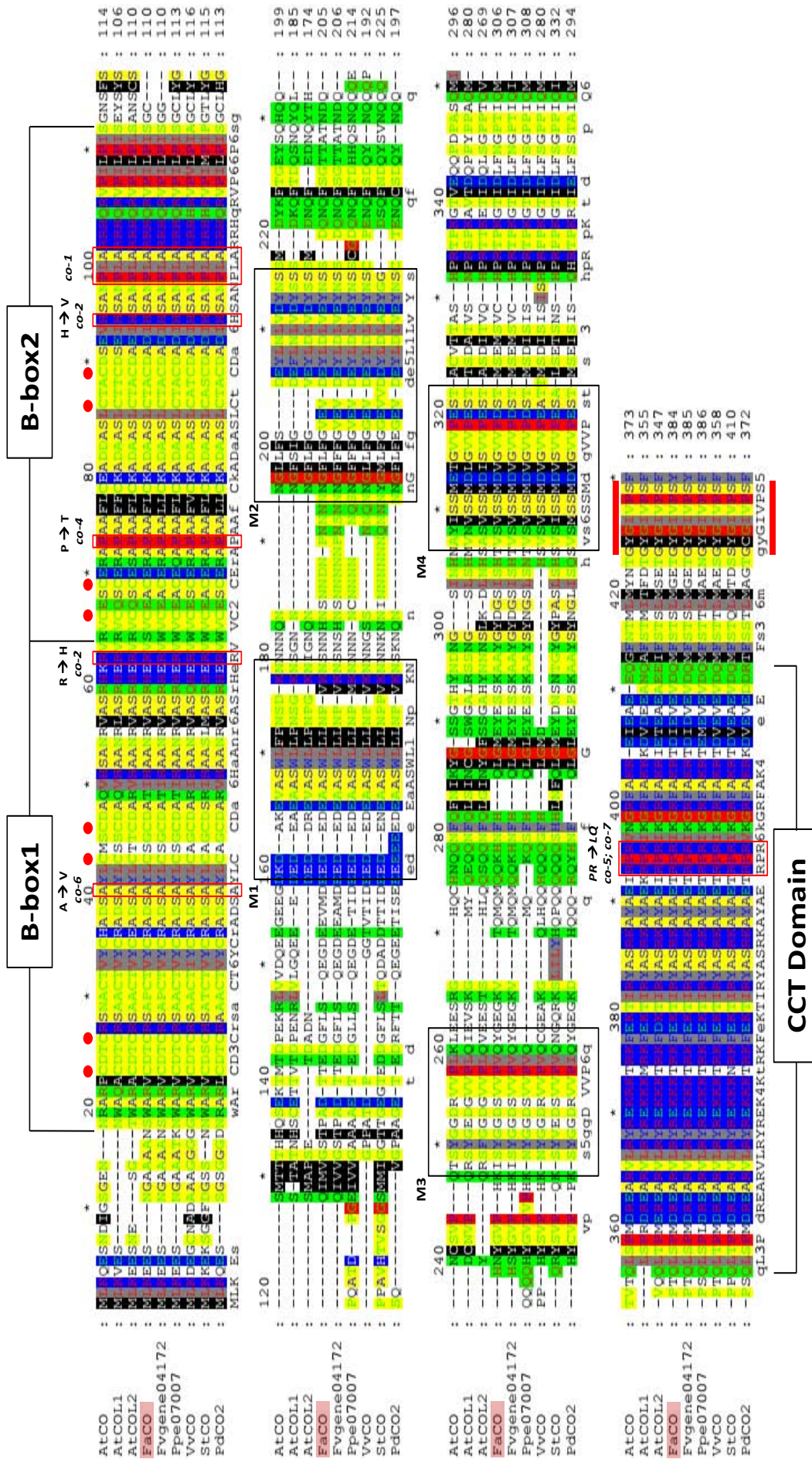


Figura 7. Alineamiento múltiple (ClustalW) de la secuencia de aminoácidos de FaCO junto a proteínas homólogas en otras especies. Con cuadro rojo se marcan los residuos afectados en los mutantes de *Arabidopsis*. Motivo 3' terminal marcado por línea roja. Puntos rojos, cisteínas conservadas motivos B-box, CCT y regiones intermedias conservadas (M1-4) marcadas en negro. Números de acceso apéndice 1 Tabla S1.

Usando las secuencias nucleotídicas de los 17 miembros de la familia COL de *Arabidopsis*, se identificaron mediante BLASTN seis secuencias con homología a ellas en el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011). Para una visión general de la familia COL en *Fragaria* se realizó un árbol filogenético usando las secuencias proteicas provenientes del ensamblaje del genoma de *F. vesca*, el gen clonado en *F. × ananassa* (FaCO), los 17 genes de *Arabidopsis* así como distintas secuencias de otras angiospermas ya descritas en la bibliografía o predichas en distintas bases de datos para *CONSTANS* o *CONSTANS-like*. En este árbol podemos observar que en el genoma de *F. vesca* existen representantes de los tres grupos que conforman la familia COL en *Arabidopsis*. Además, podemos observar como FaCO (y *Fvgene04172*) se encuentra en el mismo clado que AtCO (Figura 8).

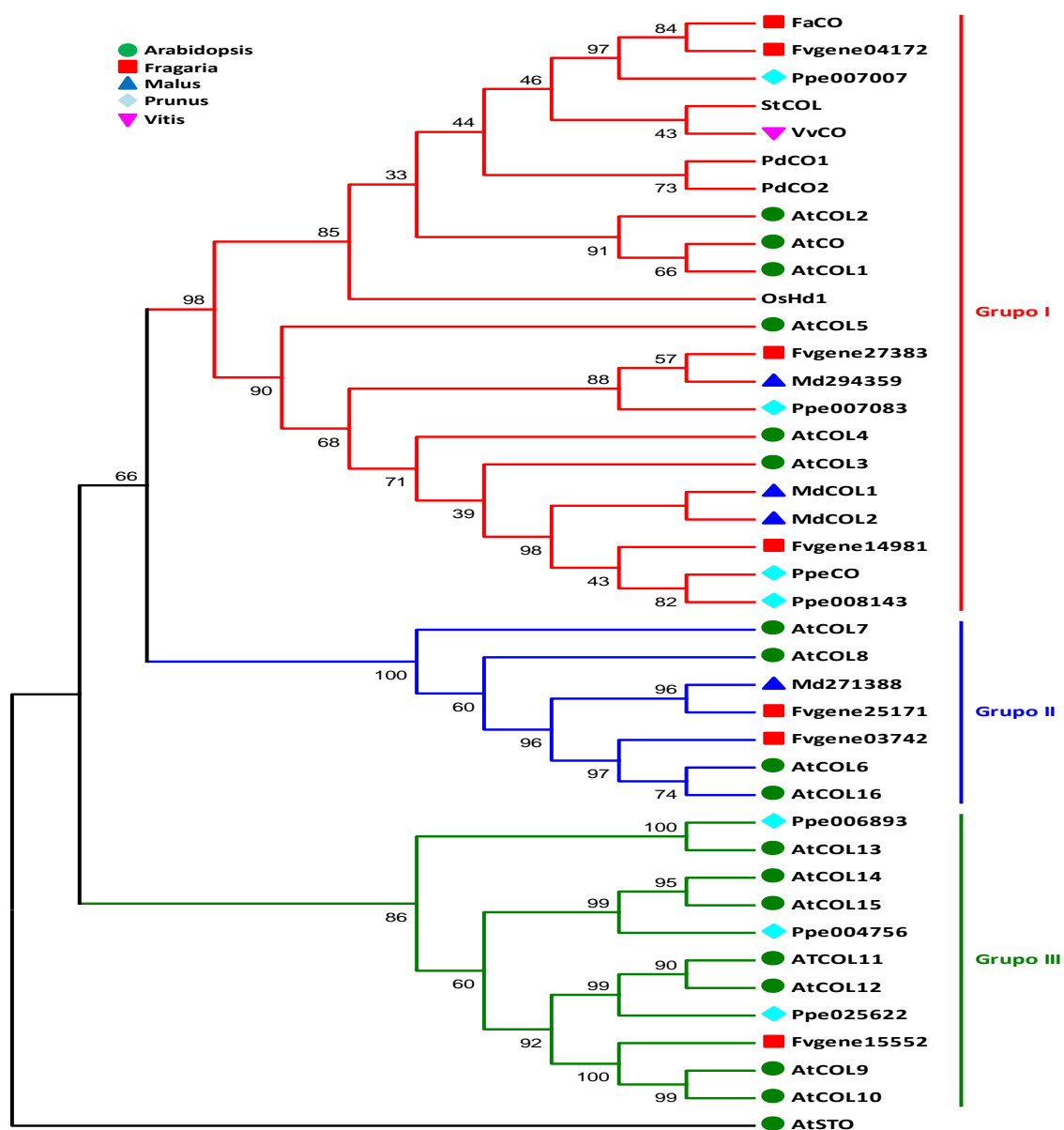


Figura 8. Árbol filogenético generado a partir de las proteínas homólogas a la familia AtCOL en distintas especies. Puntos verdes, proteínas de *Arabidopsis*. En rojo, proteínas homólogas en *Fragaria*. En azul, proteínas homólogas en *Malus doméstica*. Celeste, proteínas homólogas en *Prunus persica*. Rosa, proteínas homólogas e *Vitis vinifera*. Obtenido mediante el programa Mega v5.1, 1000 réplicas Bootstrap, método Neighbor-joining. Se muestra solo topología. AtSTO usado como grupo externo. Números de acceso en apéndice 1 Tabla S1.

Para determinar la relación evolutiva existente entre FaCO con otras proteínas de angiospermas, se realizó un árbol filogenético usando únicamente los miembros pertenecientes al grupo I. En el árbol filogenético resultante se observa como FaCO se localizó en el mismo clado que VvCO, StCO y PdCO1-2, todos ellos descritos en la bibliografía como ortólogos a AtCO (**Figura 9**). La proteína más cercana a FaCO fue la predicha para el gen *Fv04172-v1.0-hybrid* de *F. vesca*, especie muy relacionada, y cuya secuencia fue usada referencia en el diseño de los cebadores para el clonaje del gen *FaCO* de *F. × ananassa*.

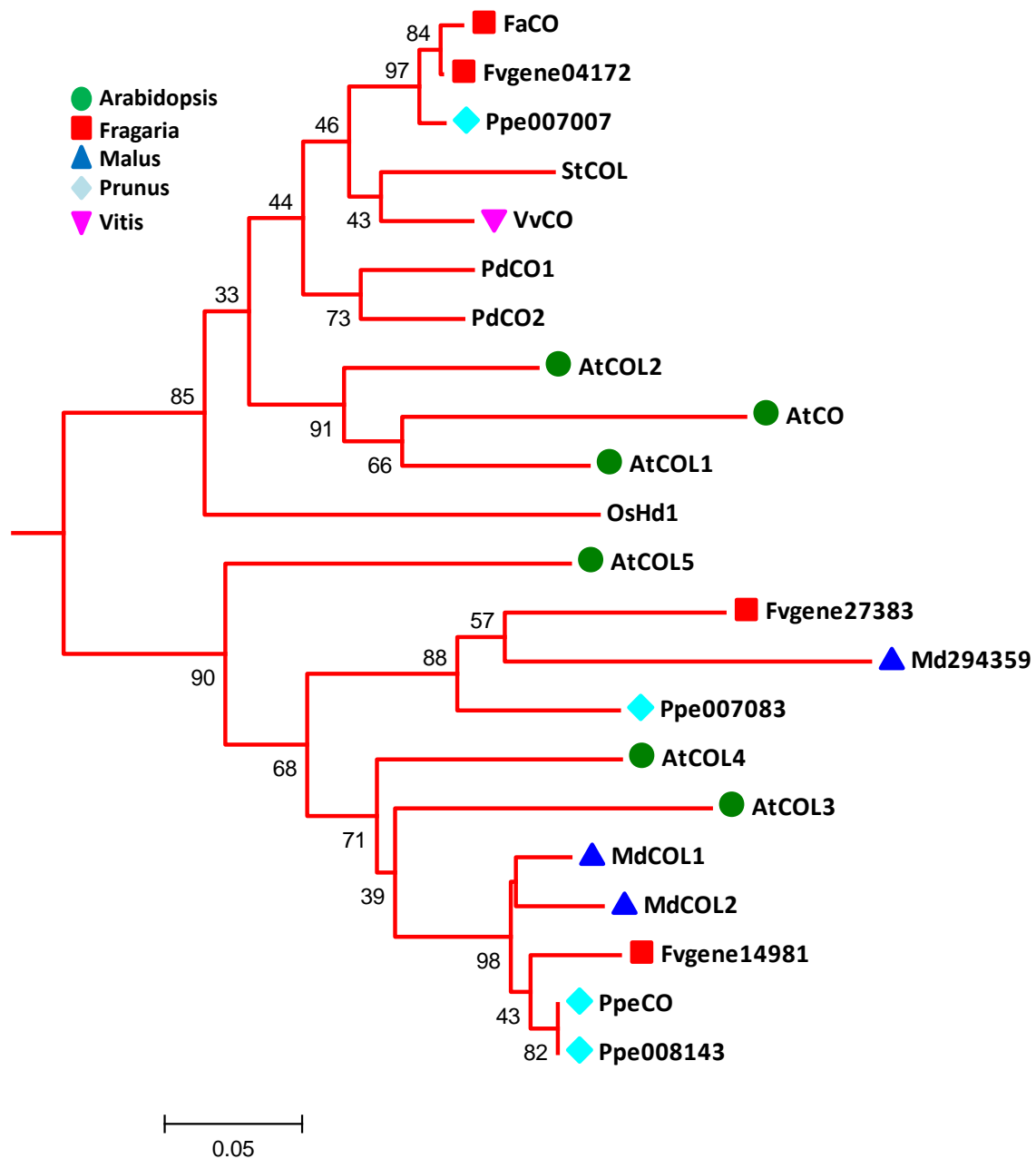


Figura 9. Árbol filogenético a partir de las secuencias proteicas del Grupo I familia COL. Puntos verdes, proteínas en *Arabidopsis*. En rojo, proteínas homólogas de *Fragaria*. En azul, proteínas homólogas en *Malus doméstica*. Celeste, proteínas homólogas *Prunus persica*. Rosa, proteínas homólogas en *Vitis vinifera*. Obtenido mediante el programa Mega v5.1, 1000 réplicas Bootstrap, método Neighbor-joining. Números de acceso en apéndice 1 Tabla S1.

3.1.2 Análisis de la expresión de *FaCO* en distintos órganos.

Para tener una primera aproximación del papel que ejerce *CONSTANS* en *F. × ananassa*, se analizó la expresión relativa de *FaCO* en diferentes órganos del cultivar ‘Chandler’ (Figura 10). Las muestras de ARN se extrajeron de hojas, raíz y corona, en condiciones de “Día corto” (SD) y en flor cerrada, fruto verde, fruto blanco y fruto rojo, durante la época productiva (primavera). Los niveles de expresión más altos se encontraron en hoja, siendo menores en corona y bajos en la raíz. El gen *FaCO* también se expresó en niveles altos en los órganos reproductores, desde la flor y

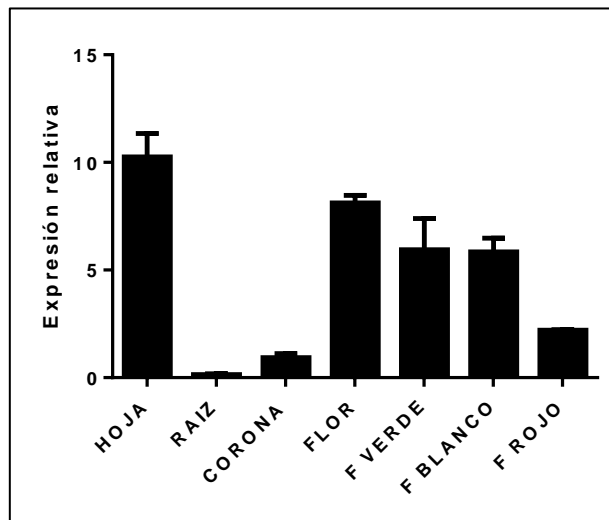


Figura 10. Expresión relativa de *FaCO* en los distintos órganos de ‘Chandler’ relativizados a la expresión en corona y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes ($n = 3$).

disminuyendo su expresión conforme avanza la formación y maduración del fruto. La elevada expresión encontrada en hoja es consecuente con la bibliografía, ya que es en hoja donde *CONSTANS* desarrolla su función en *Arabidopsis* como activador de la floración en condiciones inductoras de fotoperiodo. No olvidemos que ‘Chandler’ es un cultivar con floración estacional, cuya inducción ocurre en condiciones de SD.

3.1.3 Control de la expresión de *FaCO* por el ritmo circadiano.

En *Arabidopsis* y otras especies como *Vitis vinífera* el gen *CO* muestra un patrón de expresión diario controlado por el ritmo circadiano (Suarez-López *et al.*, 2001; Almada *et al.*, 2009). Para determinar si el gen *FaCO* está regulado de la misma manera, se analizó la expresión mediante qRT-PCR en muestras de hoja tomadas cada cuatro horas, hasta completar 24 horas (7 estaciones de muestreos). Los muestreos se llevaron a cabo en condiciones de luz natural de SD (en otoño) y de LD (en verano). Además, fue repetido en dos cultivares, con diferente comportamiento frente al fotoperiodo, como son ‘Chandler’ (floración de SD) y ‘Selva’ (reflorecente o DN).

En la Figura 11 podemos observar como los niveles de expresión de *FaCO* fluctúan a lo largo del día, disminuyendo su expresión durante el periodo de luz y aumentando en el de oscuridad. Así, los niveles más altos de expresión se observaron en el alba, al finalizar el periodo de oscuridad tanto en SD (Figura 11A) como LD (Figura 11B). Igualmente, en ambos fotoperiodos, los niveles más bajos de expresión se presentaron al final del periodo de iluminación recuperándose gradualmente la expresión durante el siguiente periodo de

oscuridad. Ambos cultivares se comportaron de manera similar en ambos fotoperiodos aunque el cultivar 'Selva' recuperó más rápidamente que 'Chandler' la expresión nocturna de *FaCO* en SD. En vistas de los resultados obtenidos, podemos concluir que la expresión de *FaCO* se encuentra regulada de una manera clara por el ritmo circadiano. Sin embargo, no existieron diferencias de expresión entre cultivares en LD, por lo que la diferencia en el tipo de floración entre un cultivar de SD y uno de día neutro o reflorecente no parece deberse a la actuación de *FaCO*.

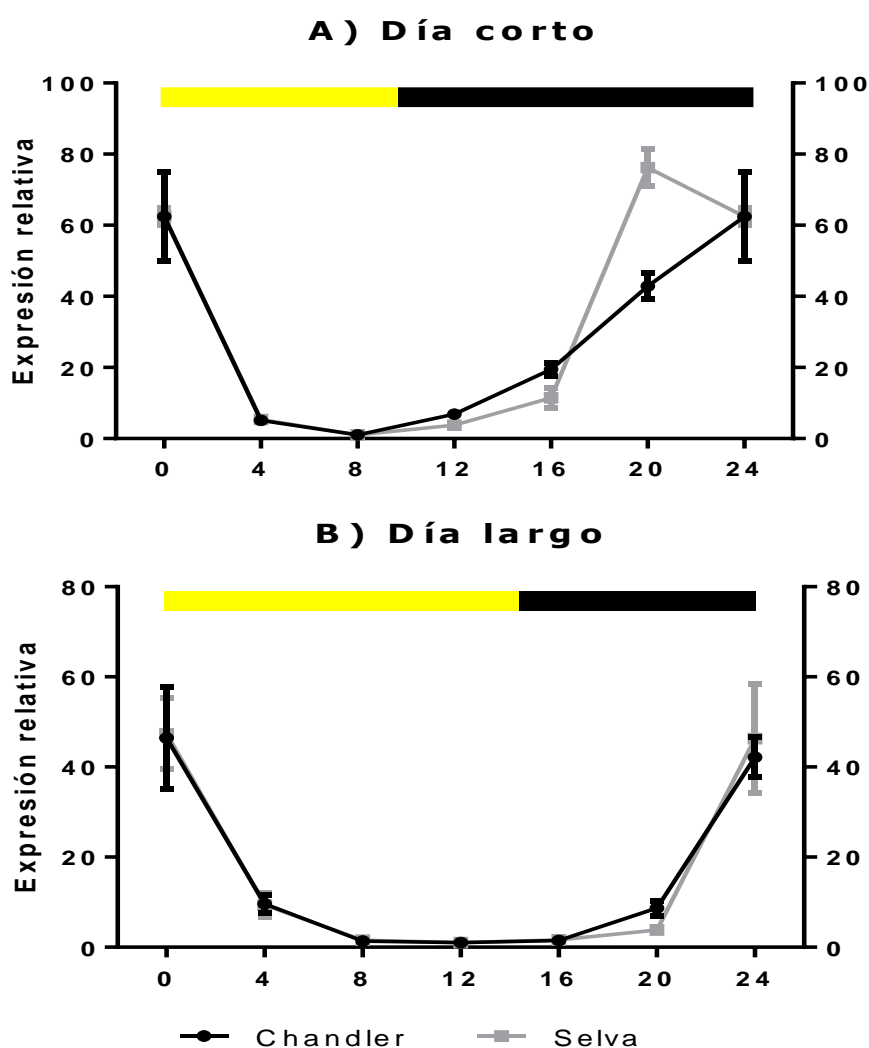


Figura 11. Patrón de expresión de *FaCO* a lo largo del día en dos condiciones de fotoperiodo, SD (A) y LD (B). Las muestras de hoja se tomaron cada cuatro horas, en tres réplicas biológicas con al menos 3 plantas cada una. La barra amarilla representa horas de luz y la negra oscuridad. El primer muestreo (0h) se realizó al amanecer en ambos casos. Expresión relativizada independientemente para cada cultivar frente al muestreo trascurridas 8 horas y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. Barra de error representa la desviación estándar (n = 3).

3.1.4 Diferencias de expresión de *FaCO* entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.

Con el objetivo de discernir si existen diferencias de expresión de *FaCO* entre distintos cultivares de fresa, decidimos medir la expresión de *FaCO* en cuatro cultivares diferentes. Dos de ellos se caracterizan por una floración estacional de día corto ('Chandler' y 'Parker') y los otros dos de día neutro ('Selva' y 'Fern'). Basándonos en los resultados previos, realizados sobre varios órganos diferentes (**Figura 10**) y teniendo en cuenta que los estudios se centran en la implicación de *FaCO* sobre floración, decidimos realizar las mediciones de expresión mediante qRT-PCR únicamente sobre hoja y corona. Los niveles de expresión relativos de *FaCO* se cuantificaron tanto en condiciones de SD (representado en negro) como en LD (representado en gris) en los cuatro cultivares estudiados (**Figura 12**). Los resultados obtenidos fueron muy variables entre los cuatro cultivares, no observándose patrones que pudieran distinguir las variedades de SD de las de LD. Así, para 'Parker' y 'Fern', la expresión de *FaCO* fue mayor en hojas en SD que en LD aunque el primero es un cultivar de SD y el segundo es de floración neutra. Debido a lo laborioso de la separación de los distintos órganos de la planta, como se explica en Material y Métodos (apartado 2.2.2), el muestreo tuvo lugar a lo largo de una mañana. Por tanto los resultados obtenidos en este experimento estuvieron muy influenciados por el ritmo circadiano observado claramente en la **Figura 11**, y que todavía no conocíamos. Las diferencias de expresión entre hoja y corona (en ambos fotoperiodos) fueron mayores en 'Fern' que en el resto de cultivares, ya que este cultivar fue el primero que se muestreó, cuando los niveles de expresión en hoja son más altos (**Figura 11**). El último cultivar que se muestreó fue 'Selva', cuando los niveles de expresión están en sus niveles mínimos. En corona no se obtuvieron diferencias de expresión entre SD y LD en ninguno de los cultivares (**Figura 12**).

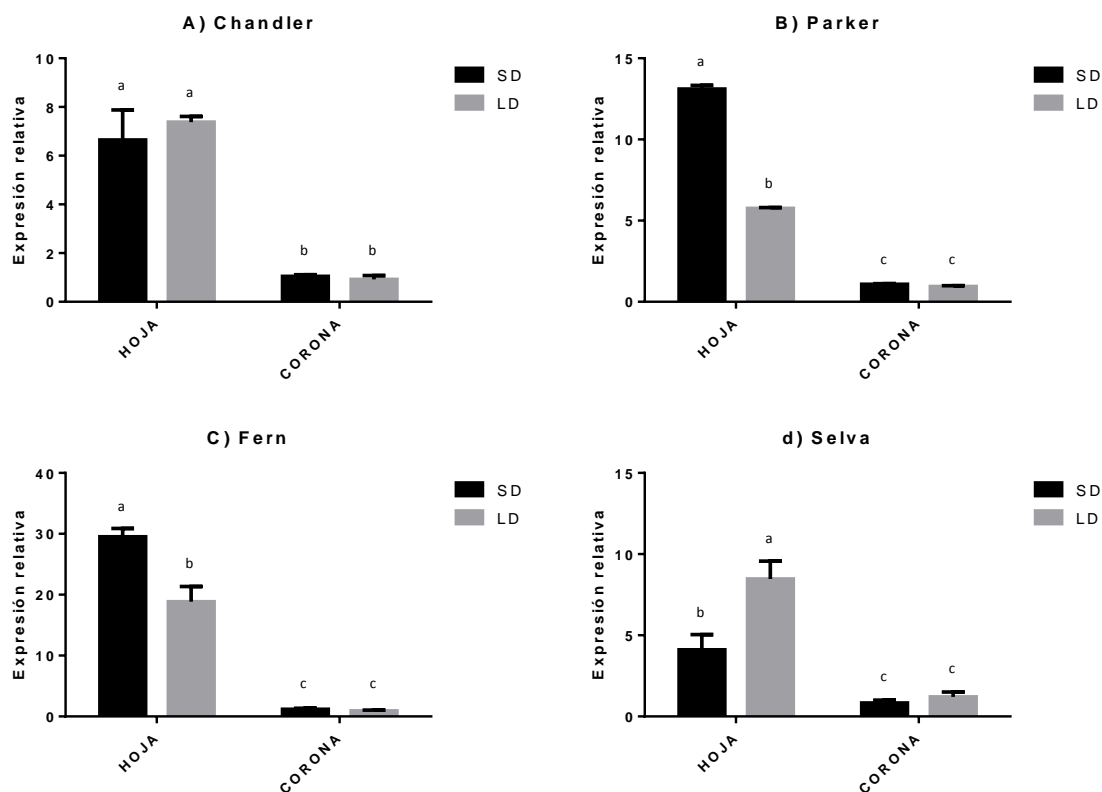


Figura 12. Expresión relativa de *FaCO* bajo condiciones de fotoperiodo de SD (barra en negro) y LD (barra en gris), para cuatro cultivares distintos: dos de día corto (A) 'Chandler' y (B) 'Parker'; y dos de día neutro: (C) 'Fern' y (D) 'Selva'. Expresión relativizada a CORONA-LD en todos los casos y datos normalizados a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de al menos dos réplicas biológicas. Las letras representan las diferencias observadas mediante ANOVA de dos vías y Post-Hoc LSD de Fisher. Resultados del análisis estadístico en Apéndice 2 Tabla S4

3.1.5 Análisis de la sobre-expresión de *FaCO* en 'Camarosa'.

Para tratar de conocer la función de *FaCO* en fresa se generaron, por transformación genética estable mediada por *A. tumefaciens*, plantas transgénicas de fresa (*F. × ananassa* cv. Camarosa) que expresan este gen bajo el control de promotor constitutivo *CaMV35S*. La construcción se llevó a cabo en el vector primario pBINPLUS con resistencia a Kanamicina y se usó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Tras la transformación de unos 200 discos de hoja y varios subcultivos en presencia del antibiótico, se obtuvo un elevado número de líneas transformantes independientes. Las líneas fueron confirmadas mediante PCR sobre ADN genómico. De todos los transformantes obtenidos y confirmados, se escogieron diez líneas y se las sometió a un periodo de aclimatación adecuado antes de pasarlas a tierra.

Una de las líneas transgénicas se perdió durante la aclimatación por lo que solo 9 fueron finalmente establecidas en el invernadero, procediéndose a la evaluación de los niveles de sobre-expresión de *FaCO* que presentaba cada línea. El muestreo se realizó sobre hojas tomadas a las 16:00 de la tarde, cuando los niveles de *FaCO* endógeno son más bajos. En la **Figura 13A** se representan los niveles de expresión mediante qRT-PCR de las nueve líneas aclimatadas y 2 líneas control de transformación (Pgus2 y Pgus3; *35S:GUS*). Las nueve líneas transformantes presentaron niveles de expresión de *FaCO* superiores a los controles, identificándose líneas con alta sobre-expresión (líneas 11, 13, 15 y 22) y otras con sobre-expresión menos acusada aunque significativa (líneas 12, 14, 21, 40 y 42). Además, los niveles de expresión de *FaCO* endógeno en ambas líneas control fueron muy similares.

3.1.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).

Al tratarse de líneas que provienen de un largo proceso de transformación y multiplicación *in vitro*, su comportamiento puede ser muy variable y poco consistente durante el primer año de cultivo en maceta. Además, la regeneración de las plantas transgénicas y su cultivo *in vitro* se realiza en fotoperiodo de LD, lo que ocasiona que las plántulas no hayan sufrido una inducción floral adecuada por SD. Por ello, durante el primer año se realizó un exhaustivo seguimiento, para escoger las líneas más prometedoras para su posterior estudio detallado durante un segundo año. El seguimiento de las líneas comenzó en enero y se extendió hasta inicios de septiembre del año 2014. A lo largo de esta campaña se tomaron datos de inicio de floración, para ver la precocidad de las líneas y se contó el número total de flores producidas por planta, para determinar si existía una mayor inducción de meristemas florales. Además se evaluaron otros efectos fenotípicos que pudieran haber afectado el desarrollo de la planta como su vigor y tamaño *de visu*, así como la capacidad de producción de estolones. Así, se observó que todas las líneas transformantes *35S:FACO* (exceptuando la línea 14) presentaron un crecimiento vegetativo sensiblemente inferior a las plantas control (**Figura 13A** tabla anexa y **Figura 14**). En

general, las líneas transgénicas *35S:FaCO* presentaron un tamaño de hoja más pequeño y como consecuencia un tamaño de planta menor, tanto en altura como en diámetro (**Figura 13A** tabla anexa y **Figura 14**). Durante el periodo estival (LD), las líneas 22, 40 y 42 no llegaron a estolonar y exceptuando a la línea 13, el resto generaron un número reducido de estolones (**Figura 13A** tabla anexa). Aun teniendo un crecimiento vegetativo menor, la mayoría de las líneas transgénicas florecieron antes que los controles, a excepción de las líneas 12 y 22 (**Figura 13B**). Como media, las plantas transgénicas florecieron ocho días (o 17 días si excluimos la línea 22) antes que los controles. Existiendo líneas que florecieron incluso 37 días antes: líneas 15 y 40.

Respecto al número total de flores producidas, la mayoría de las líneas transgénicas produjeron un número similar de flores a la línea control *Pgus2*. Únicamente las líneas 14 y 40 produjeron un número significativamente mayor que ambas líneas control. También podemos observar como el número de flores durante el último mes de estudio apenas cambia lo que sugiere que la sobre-expresión de *FaCO* no es suficiente para inducir floración en condiciones de LD (**Figura 13C**).

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos durante el periodo de floración, los niveles de sobre-expresión y la capacidad para estolonar de cada línea (**Figura 13** y **Figura 14**), se decidió multiplicar vegetativamente, mediante estolones, las líneas 11, 12, 13 y 21 y proceder a su evaluación en un segundo año. Aunque existían líneas transgénicas con un comportamiento en floración más prometedor, como la línea 40, su incapacidad para estolonar hizo inviable su uso.

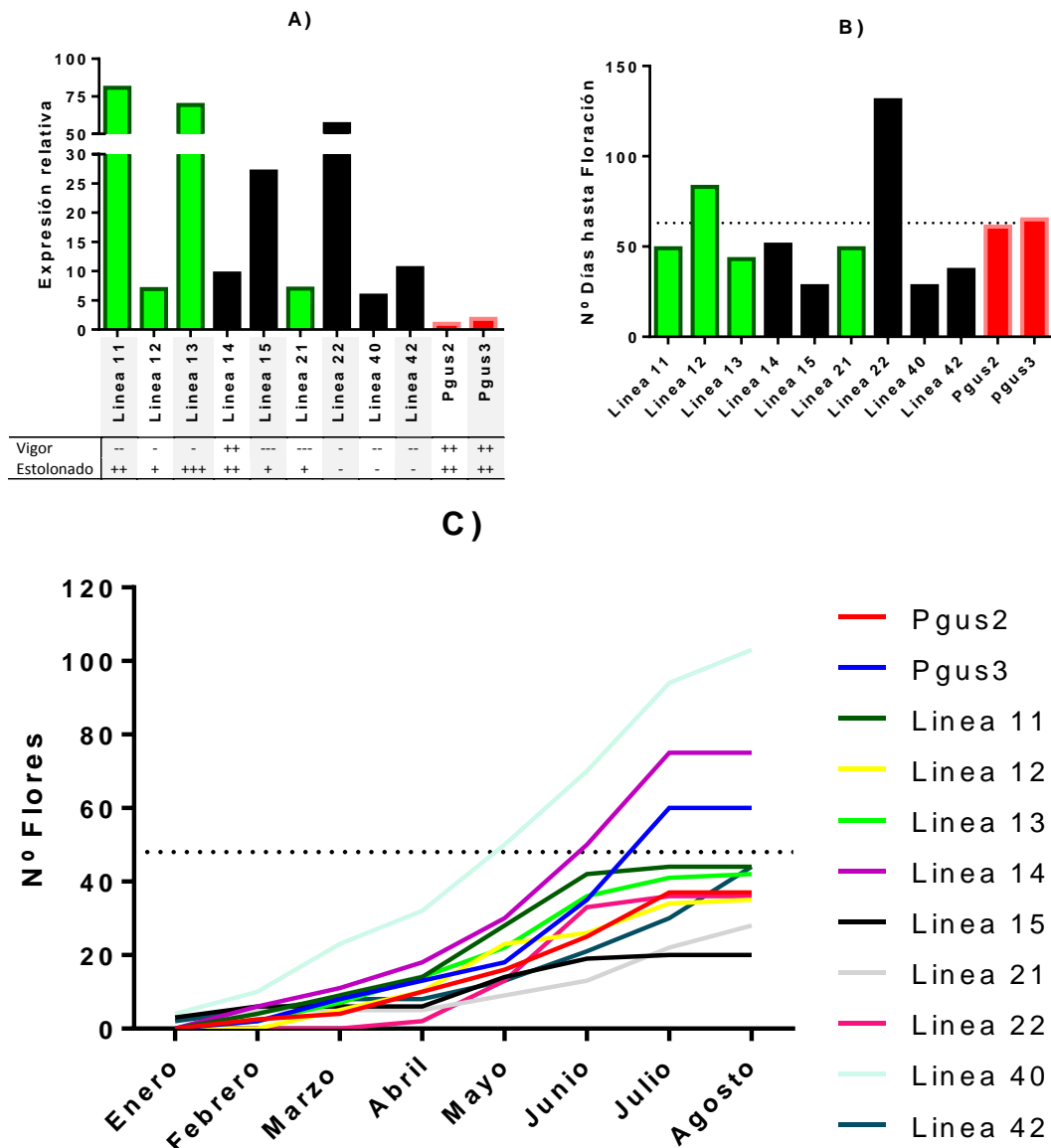


Figura 13. A) Niveles de expresión de FaCO en las líneas transgénicas 35S:FaCO, medidos por qRT-PCR. Barras en verde, líneas seleccionadas para su estudio en una segunda campaña; barras en negro, líneas no seleccionadas y barras en rojo, líneas control. En la tabla adjunta se esquematiza el vigor (cuantos más guiones menor es el vigor) comparado con las líneas control (++) normal) y la capacidad de estolonado observada en cada línea, en este caso el guion indica ausencia de estolonado y las cruces más, menor o igual capacidad de estolonado que los controles (++) **(B) Número de días hasta la primera flor** visible en cada línea transgénica y los controles, medidos desde la finalización de la aclimatación. La línea de puntos representa la media de días hasta el inicio de la floración de las líneas control (63 días). **(C) Número de flores producidas por cada línea** desde el 1 de Enero hasta el 31 Agosto. La línea horizontal discontinua marca la media del número de flores producidas por los controles (48 flores).



Figura 14. Fotos de algunas de las líneas transgénicas *35S:FaCO* y el control de transformación *Pcus2* (tomado como referencia de las líneas control *35S:GUS*).

3.1.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).

En el segundo año de análisis se multiplicaron y cultivaron las cuatro líneas *35S:FaCO* seleccionadas: línea 11, línea 12, línea 13 y línea 21 (ver apartado anterior). De cada línea se evaluaron 9 plantas (réplicas biológicas) obtenidas por multiplicación vegetativa. Como controles se usaron 16 réplicas, 5 del control de P_{gus3} y 11 de la línea control P_{gus2} (ambos controles de transformación). Ya que no existieron diferencias significativas entre los dos controles durante el primer año, se trataron como un solo control durante el segundo año. Además, se usaron 9 plantas de ‘Camarosa’ (nombrada ‘Camarosa’ Wild type) que no habían sufrido el proceso de transformación.

Durante la multiplicación vegetativa de las líneas, en los meses de Agosto, Septiembre y Octubre se produjo en el invernadero un brote importante de araña blanca (*Steneotarsonemus pallidus* Banks.) que afectó por igual a las madres y a los estolones de las líneas transgénicas en evaluación. Como consecuencia de ello, la mayoría de las réplicas usadas durante esta segunda campaña mostraban síntomas de la plaga. Al principio, durante los meses de diciembre y enero, los síntomas eran evidentes, existiendo réplicas muy afectadas. Conforme fue avanzando el estudio, gracias a los sucesivos tratamientos, las plantas fueron mejorando paulatinamente, pero aun así varias réplicas murieron o no pudieron ser evaluadas correctamente. Concretamente en el caso de *35S:FaCO* la línea 21 fue la más afectada, con unos síntomas muy acusados que afectaron gravemente a su crecimiento, desarrollo y floración, por lo que no será tomada en cuenta en el análisis de los resultados. Además, la plaga mató tres plantas, dos de la línea 12 y una de la línea 13, dejando al final 7 y 8 clones respectivamente.

El seguimiento de las líneas comenzó en diciembre de 2014 y se extendió hasta inicios de septiembre del año 2015. A lo largo de esta campaña se tomaron datos de inicio de floración, para ver la precocidad de las líneas y se contó el número total de flores producidas por cada planta, para determinar si existía una mayor inducción de meristemas florales. Además se evaluaron otros efectos fenotípicos que pudieran afectar al desarrollo de la planta como su vigor y tamaño *de visu*, así como el inicio del estolonado. En este año solo la línea 13 mostró un adelanto significativo de la floración, llegando a florecer dos meses antes (59 días) que los controles de transformación (P_{gus2}+3), las otras dos líneas evaluadas florecieron al mismo tiempo que los controles (**Figura 15A**). Una vez finalizada la floración, todas las plantas (transgénicas y controles) produjeron aproximadamente el mismo número de flores (**Figura 15B**). En cuanto al estolonado, las líneas 11 y 13 sufrieron un ligero (pero significativo) adelanto, comparadas con las plantas control; mientras que la línea 12 estolono al mismo tiempo que los controles (**Figura 15C**). Aún empezando a estolonar antes, tanto la línea 11 como la 13, produjeron el mismo número de estolones

que los controles (**Figura 15D**). Sin embargo, la línea 12, al igual que el primer año (**Figura 13A**, tabla adjunta) produjo significativamente menos estolones que las plantas control.

Al comparar los datos de 2015 con los de 2014, observamos que la línea 13 fue la que floreció más temprano de las 3 líneas transgénicas en ambos años. También observamos algunas diferencias en el comportamiento de las líneas entre los dos años. Por ejemplo, la línea 11 floreció aproximadamente 15 días antes y la línea 12 sufrió un retraso de al menos 20 días el año anterior (**Figura 13B**), no encontrándose diferencias en 2015.

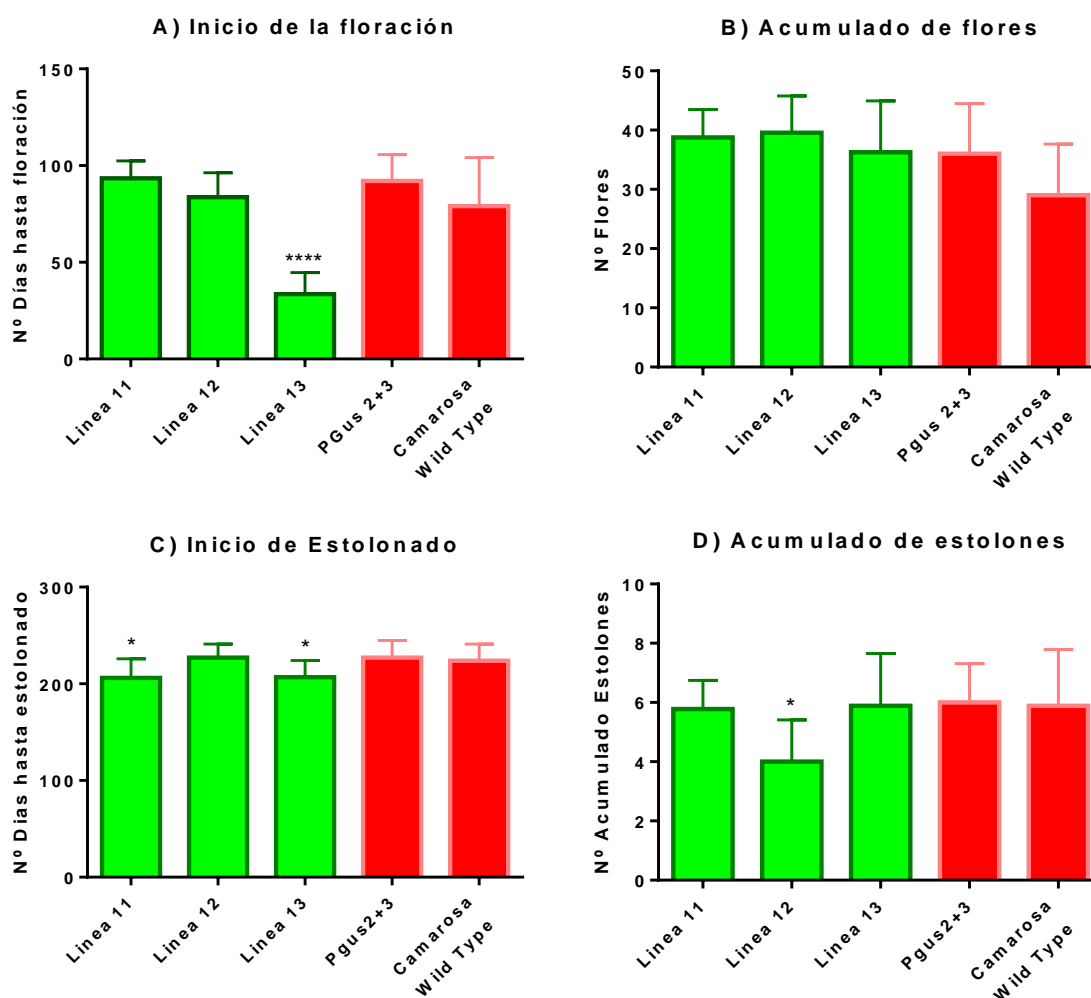


Figura 15. (A) Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas 35S:FaCO (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). (B) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de diciembre hasta el 3 de septiembre. (C) Número de días transcurridos hasta la aparición del primer estolón. (D) Número de estolones producidos por cada línea durante el periodo de estolonado evaluado. Los asteriscos representan diferencias significativas entre P gus2+3 y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.**

3.2.5.3 Evaluación en el Tercer año (2016).

Durante el verano las líneas transgénicas fueron de nuevo multiplicadas mediante estolones para su evaluación durante un tercer año. De la línea 11 se han evaluado diez réplicas (plantas) mientras que de las líneas 12 y 13 se han evaluado nueve réplicas, del control de transformación P_{gus2+3} se han evaluado 20 réplicas y del control de 'Camarosa' otras 22 plantas. Al igual que en el año anterior, la evaluación de las líneas comenzó en Diciembre.

En la **Figura 16** se puede observar como todas las líneas transgénicas sufren un retraso en la floración durante este tercer año, siendo significativo en el caso de la línea 12. Ni siquiera la línea 13, la cual adelanto su floración casi dos meses el año anterior, ha florecido antes que los controles. La principal diferencia existente es que en esta última temporada, las líneas control han florecido mucho antes que el año anterior (37 días).

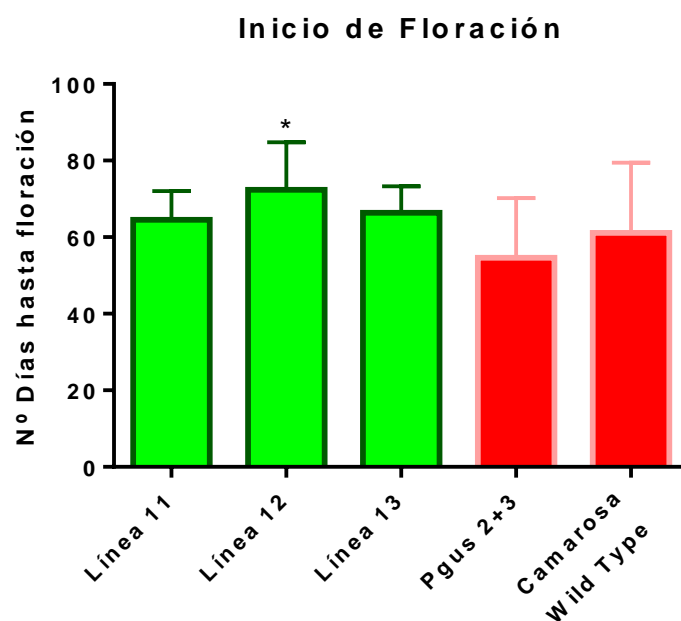


Figura 16. Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas **35S:FaCO** (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). Los asteriscos representan diferencias significativas entre P_{gus2+3} y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.

3.2 Caracterización del gen *FLOWERING LOCUS D (FD)* en *Fragaria × ananassa*.

3.2.1 Identificación de genes con homología a *AtFD* en fresa

El gen *FLOWERING LOCUS T (AtFT)* de *Arabidopsis* codifica para una proteína que actúa como activador de la floración, sirviendo como nexo de unión de varias rutas reguladoras de la misma. Se transcribe en las hojas y viaja por el floema hasta el meristemo, donde interacciona proteína a proteína con *FLOWERING LOCUS D (FD)*, un factor de transcripción bZIP. En *Arabidopsis*, el complejo FT/FD activa la expresión de genes como *AP1* produciéndose la inducción floral (Abe *et al.*, 2005, Wigge *et al.*, 2005). Debido a que no existen estudios previos sobre *FD* en la fresa, decidimos comprobar si el genoma de *F. × ananassa* presentaba genes homólogos y si la función de *FaFD* sería la misma. Una búsqueda bibliográfica previa sobre genes homólogos en otras especies mostró que es un gen poco estudiado y del que se conoce relativamente poco en otras especies aparte de *Arabidopsis*. Aun así, Mouhu *et al.* (2009) identificaron un EST (número de acceso NCBI: EX675574) encontrado en la base de datos de rosáceas (GDR; <http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr>) proveniente de *F. vesca* cv. Hawaii-4 al que nombraron como *FvFD*, ortólogo por tanto al *FD* de *Arabidopsis*. Basándonos en la secuencia de este EST, se diseñaron cebadores para clonar y secuenciar el gen en *F. × ananassa* cv. Selva. Al encontrarse la expresión de este gen restringida a las células que conforman el SAM (Wigge *et al.*, 2005) se usó cDNA obtenido a partir de ARN de la corona. El gen aislado de la fresa cultivada, que nombramos como *FaFD2* (ver más adelante), contiene un ORF de 651 bp que tiene capacidad de codificar para una proteína de 216 aa, con un peso teórico de 23,38 KDa y un PI deducido de 10,36. Entre la secuencia de EST de *F. vesca* y el gen clonado de *F. × ananassa* existen únicamente diez SNPs. Estos SNPs no se traducen en cambios importantes en la proteína, ya que los cambios se producen entre aminoácidos pertenecientes al mismo grupo químico.

Una búsqueda de secuencias homólogas mediante BlastN usando el gen *FaFD2* de *F. × ananassa* sobre el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) identificó tres predicciones génicas con homología a *FaFD2*: *gene08566-v1.0-hybrid*, *gene14556-v1.0-hybrid* y *gene11837-v1.0-hybrid*, siendo el EST de 'Hawaii-4' usado previamente 99% idéntico al *gene08566-v1.0-hybrid*. En un árbol filogenético usando algunas secuencias proteicas descritas en *Arabidopsis* pertenecientes a la familia de TF bZIP y englobadas en el mismo grupo que *AtFD* por Jacoby *et al.* (2002), como por ejemplo: *AtDPBF4*, *AtABF1*, *AtABI5*, etc. (todas ellas relacionadas con el metabolismo del ácido abscísico), así como proteínas homólogas descritas en otras especies y las secuencias predichas en el genoma de *F. vesca*; *FaFD2* se agrupó junto con la secuencia correspondiente al gen *gene08566-v1.0-hybrid* de *F. vesca*, tal como era esperable. Aunque *FaFD2* y el gen *gene08566-v1.0-hybrid* se

agruparon en un cluster junto a AtFD y otras proteínas FD descritas en la bibliografía, como son SISPTG, PtFD y VvFD, el gen de *F. vesca gene14556-v1.0-hybrid* resulto más cercano a AtFD (**Figura 17**). A pesar de encontrarse en el mismo cluster, los porcentajes de similitud entre las secuencias son muy bajos. Por ejemplo, FaFD2 presentó un 40% de similitud con AtFD y solo un 38% con la predicción proteica de *F. vesca gene14556-v1.0-hybrid*, *Malus domestica* (Md169473) o *Prunus pérsica* (Ppe018386). Un poco mayor fue el porcentaje de similitud entre la predicción proteica del *F. vesca gene14556-v1.0-hybrid* y AtFD, que fue del 47%. En general, estos porcentajes son bastante bajos, incluso entre las dos proteínas parálogas de *Arabidopsis* (AtFD y AtFDP), que presentan un porcentaje de similitud del 67,5%.

Un alineamiento de la proteína FaFD2 junto con proteínas homologas de *Arabidopsis*, *Vitis vinífera*, *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum* y las dos proteínas predichas en el genoma de *F. vesca*, mostró que FaFD2 conserva el dominio bZip propio de esta familia de factores de transcripción. El dominio bZIP es básico en el reconocimiento y unión a secuencias de ADN, así como necesario en la interacción proteína-proteína (Jacoby *et al.*, 2002). Además del dominio bZIP, en las proteínas FD-like encontramos tres motivos que suelen estar muy conservados. El primero se encuentra en el extremo N-terminal y se le suele nombrar como motivo A [(M/V)EEVWKDINLSSLHD]. El segundo motivo se le llama SLS y se encuentra en mitad de la proteína [T(A/V)LSLN]. Por último, en el extremo C-terminal se localiza un motivo muy importante en la interacción con FT, el motivo SAP [(S/T)LXRX(S/T)(A/T)(P/Q)F] (Tsuji *et al.*, 2013; Jacoby *et al.*, 2002). Sin embargo, FaFD2, presentó una serie de diferencias en estos motivos con otras proteínas FD caracterizadas. La secuencia de FaFD2 presenta tres aa de diferencia en el motivo A y SLS, aunque los cambios se producen entre aa del mismo grupo químico (**Figura 18**). Además, carece de los dos últimos aminoácidos en el extremo 3' y un cambio de alanina por metionina (justo al final), sin embargo, estos cambios no afectan al aa clave en el motivo, la serina o treonina situada antes de la metionina final, cuya fosforilación es necesaria para la unión a FT (Tsuji *et al.*, 2013; Abe *et al.*, 2005). Como podemos ver en la **Figura 18** esta serina o treonina está conservada en FaFD2, en AtFD y el resto de proteínas homólogas. También se observaron diferencias significativas con *Fv gene14556-v1.0-hybrid*, como dos aminoácidos adicionales en el extremo 5' o una delección de doce aminoácidos que solo está presente en la secuencia de *Fv gene14556-v1.0-hybrid*. La proteína FaFD2 y su ortólogo en *F. vesca* (la proteína deducida de *Fv gene08566-v1.0-hybrid*) presentan una delección mayor (16 aa, sobre la posición 130) no presente en el resto de secuencias (**Figura 18**). Por tanto, basándonos en la secuencia proteica y las relaciones evolutivas observadas en el árbol filogenético podemos concluir que hemos clonado un gen con similitud a AtFD, en cuanto a secuencia y emparentado filogenéticamente, pero que existe otro gen más parecido

(*Fvgene14556-v1.0-hybrid*) en el genoma de *F. vesca*. Por ello, al gen clonado en el 'Selva' de *F. × ananassa* lo hemos nombrado como *FaFD2*.

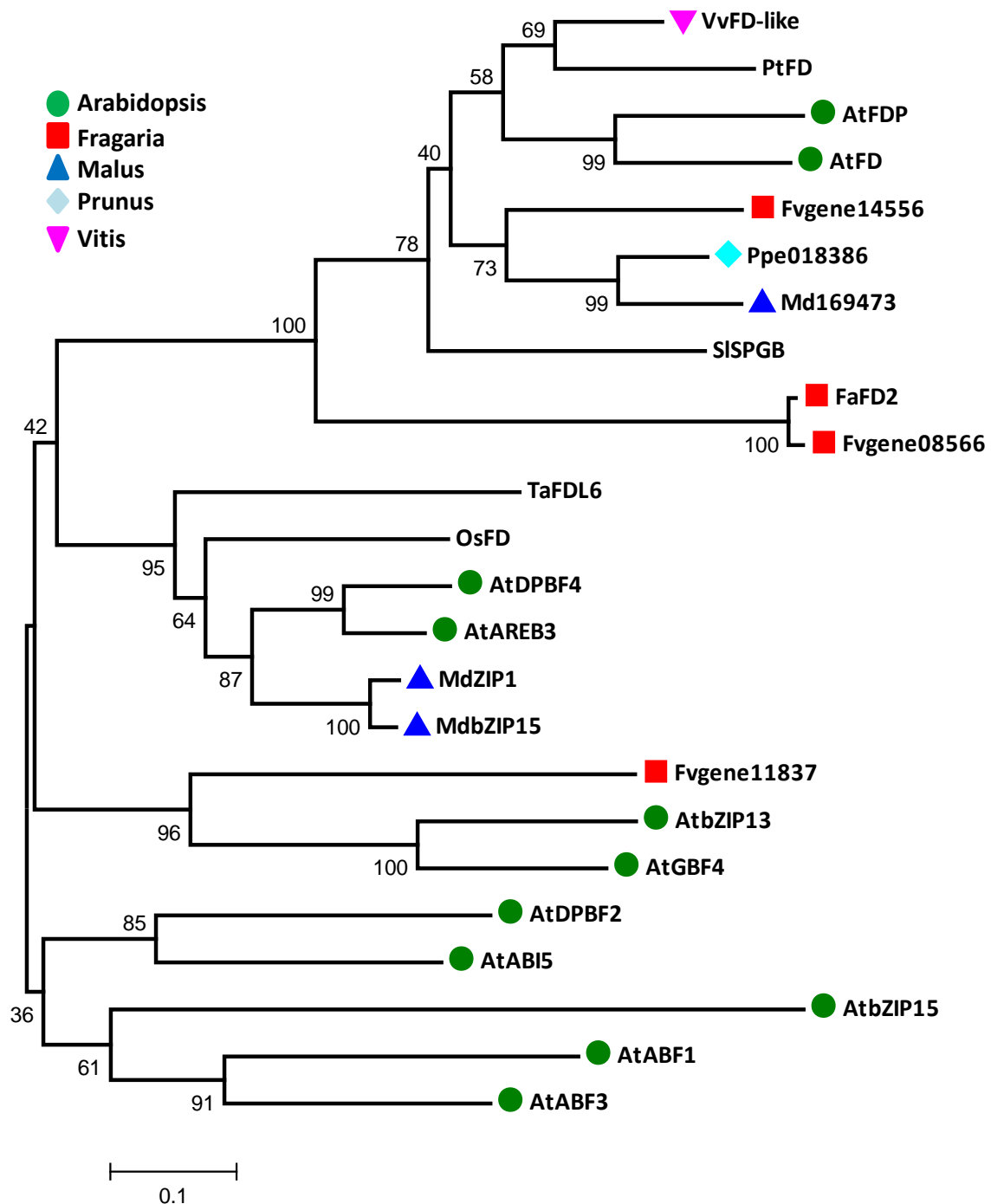


Figura 17. Árbol filogenético usando las secuencias proteicas homólogas a AtFD. Puntos verdes, proteínas de *Arabidopsis*. En rojo, proteínas homólogas de *Fragaria*. En azul, proteínas homólogas de *Malus doméstica*. Celeste, proteínas homólogas de *Prunus persica*. Rosa, proteínas homólogas en *Vitis vinifera*. Obtenido mediante el programa Mega v5.1, 1000 réplicas Bootstrap, método Neighbor-joining. Números de acceso en apéndice 1 Tabla S2.

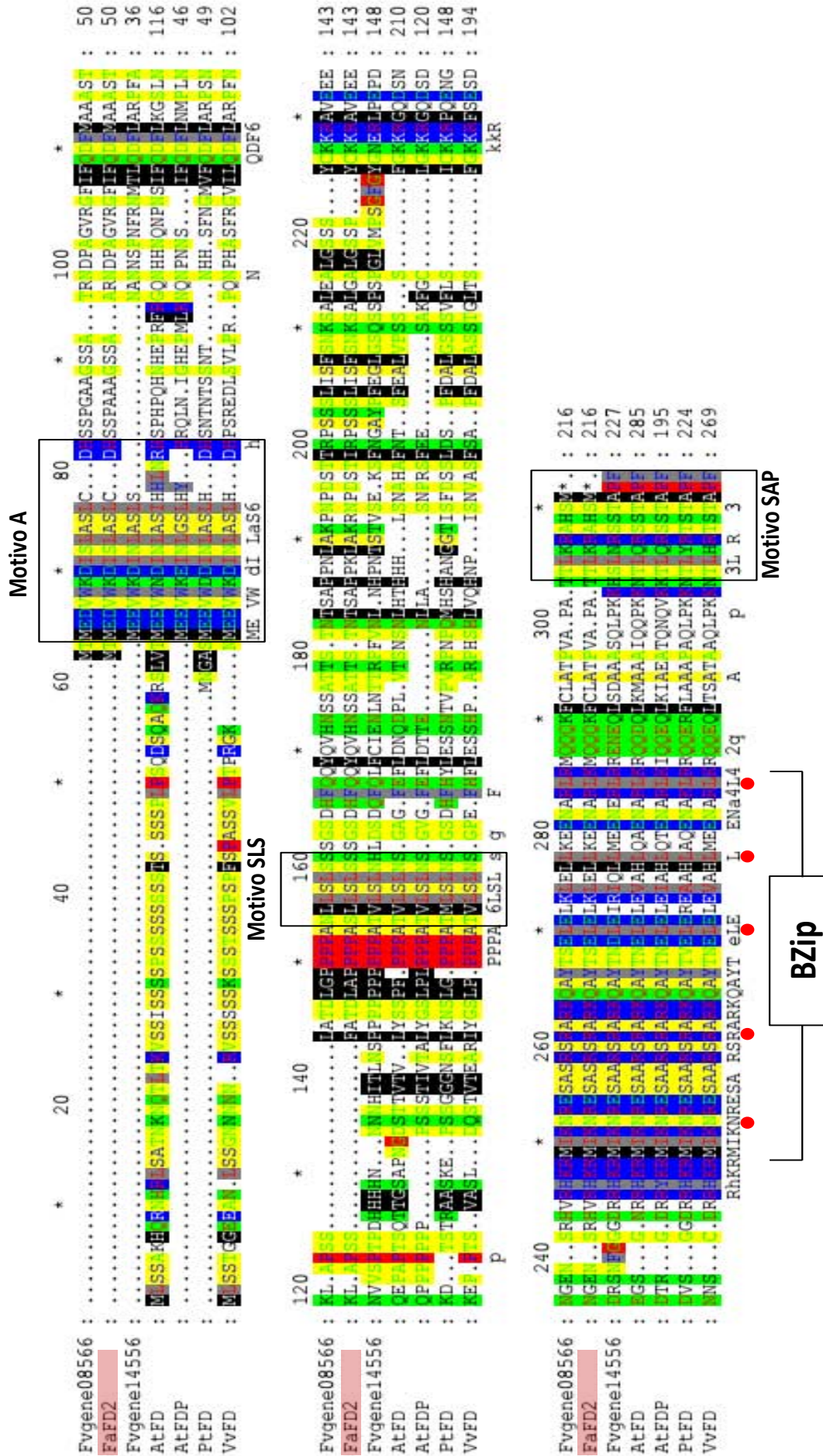


Figura 18 Alineamiento múltiple (ClustaW) de la secuencia proteica de FaFD2 junto a proteínas homólogas en otras especies. Con puntos rojo se marcan los residuos que definen el motivo bZIP. Motivos A, SLS y SAP marcados por recuadro negro.

3.2.2 Análisis de la expresión de *FaFD* y *FaFD2* en diferentes órganos.

Ya que el *gene14556-v1.0-hybrid* presentó un porcentaje de similitud mayor que *FaFD2* (y su ortólogo en *F. vesca gene08566-v1.0-hybrid*) con *AtFD* de *Arabidopsis* (47 frente a 40 %) y se clasificó más cerca que *FaFD2* en el mismo cluster que *AtFD*, es probable que *FaFD2* no sea del gen ortólogo a *AtFD*. Por este motivo decidimos cuantificar la expresión génica de ambos genes, *FaFD* y *FaFD2*, en *F. × ananassa*. Para ello, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de ellos y se cuantificó su expresión mediante qRT-PCR. Las muestras de ARN se extrajeron de hojas, raíz y corona, en condiciones de “Día corto” (SD) y en flor cerrada, fruto verde, fruto blanco y fruto rojo, durante la época productiva (primavera); todas ellas sobre el cultivar ‘Chandler’. Al medir la expresión relativa de ambos genes se obtuvieron perfiles de expresión muy diferentes (**Figura 19**). El gen *FaFD* se expresa preferentemente en corona, con una baja expresión tanto en flor como fruto. La expresión en hoja y raíz fue inexistente (**Figura 19A**). Sin embargo, *FaFD2* se expresa algo más en hoja que en raíz y corona, siendo las expresiones muy similares entre sí (**Figura 19B**). La expresión en flores y frutos, aunque presente, fue muy baja.

Las diferencias de expresión existentes entre ambos genes, sugieren que las funciones de *FaFD2* pueden ser diferentes y/o complementarias a las funciones conocidas de *FD* en *Arabidopsis*, cuya expresión está localizada principalmente en el meristemo.

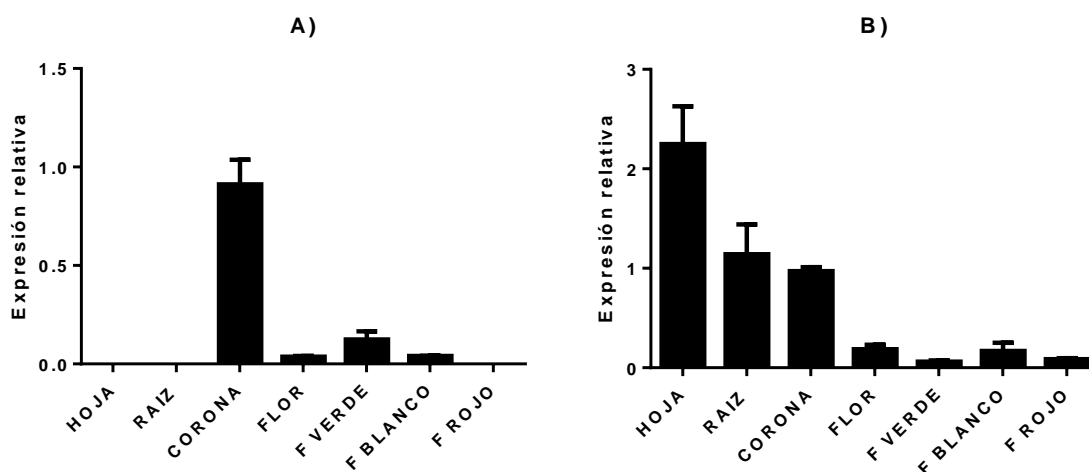


Figura 19. Expresión relativa de (A) *FaFD* y (B) *FaFD2* en los distintos órganos de ‘Chandler’. Relativizados a la expresión en corona y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes (n = 3).

3.2.3 Diferencias de expresión de *FaFD2* entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.

Al medir la expresión de los genes *FaFD* y *FaFD2*, en cuatro cultivares distintos y en dos condiciones de iluminación diferentes, como son SD y LD, al igual que en el estudio previo por tejidos se observaron sensibles diferencias entre ambos genes (**Figura 20**). Para *FaFD*, las mediciones se realizaron sobre la corona, ya que es en el único tejido donde encontramos una expresión significativa. Se observaron diferencias de expresión en los cultivares de DN ‘Selva’ y ‘Fern’, en los que la expresión de *FaFD* en SD fue significativamente mayor que en LD, permaneciendo sin diferencias en los cultivares de SD. La disminución en el nivel de expresión en LD con respecto a SD en los cultivares de día neutro fue de un 30% y un 27% para ‘Fern’ y ‘Selva’, respectivamente. Aunque estas diferencias no son muy elevadas, fueron significativas (**Figura 20**).

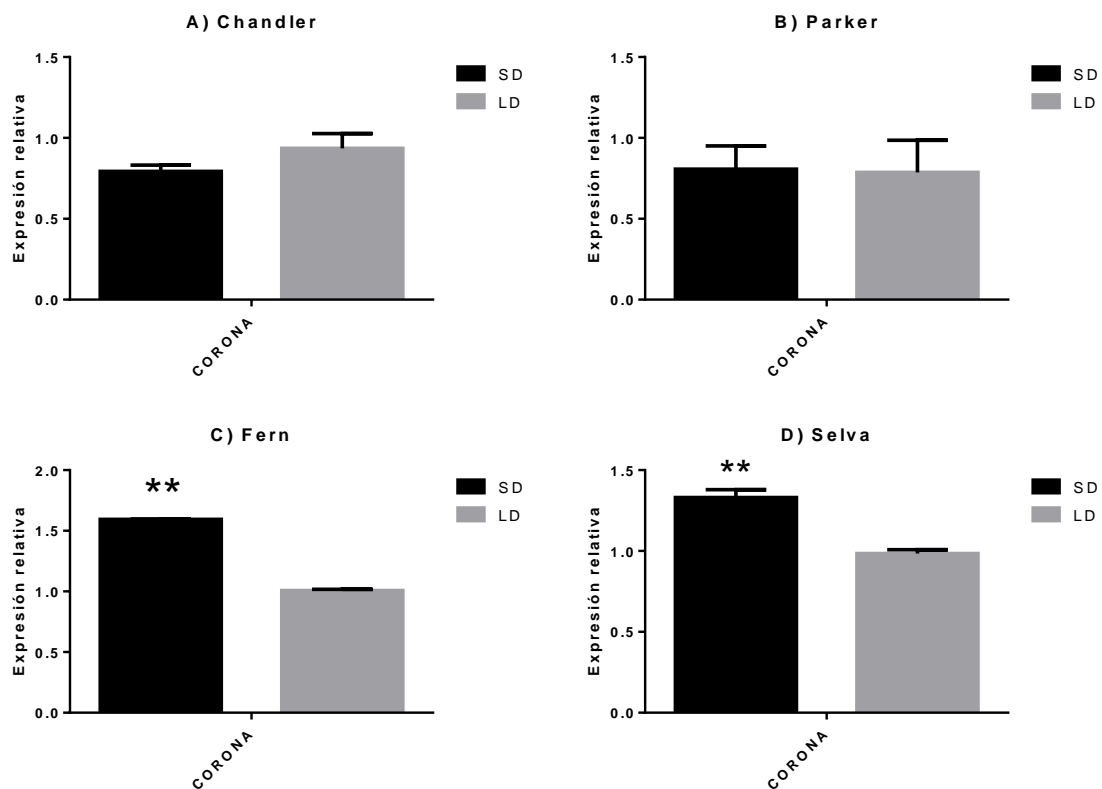


Figura 20. Expresión relativa de *FaFD* bajo condiciones de fotoperiodo de SD (barra en negro) y LD (barra en gris), para cuatro cultivares distintos: dos de día corto (A) ‘Chandler’ y (B) ‘Parker’; y dos de día neutro: (C) ‘Fern’ y (D) ‘Selva’. Expresión relativizada a CORONA-LD en todos los casos y datos normalizados a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de tres réplicas biológicas (n = 3). Los asteriscos representan diferencias significativas entre SD y LD; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001. T-test de Welch.

Los niveles de expresión de *FaFD2* en hoja y corona, en condiciones de SD, fueron significativamente más elevados que los obtenidos en los mismos tejidos bajo condiciones de LD (**Figura 21**). Las cuatro variedades se comportaron de igual forma en estos tejidos, por lo que no existieron diferencias significativas entre los cultivares con floración neutra o estacional, lo que sugiere que la variación natural observada en este carácter en las accesiones con distinto comportamiento frente al fotoperiodo no se debe a una expresión diferencial de este gen.

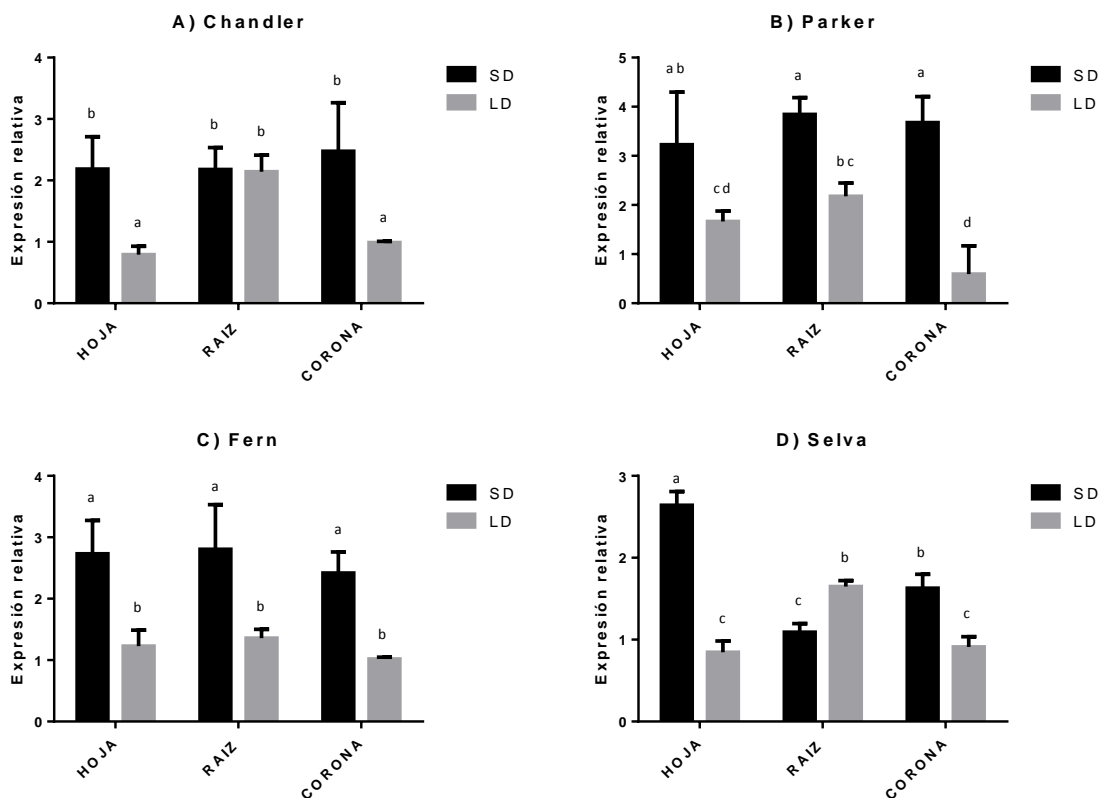


Figura 21. Expresión relativa de *FaFD2* bajo condiciones de fotoperiodo de SD (barra en negro) y LD (barra en gris), para cuatro cultivares distintos: dos de día corto (A) 'Chandler' y (B) 'Parker'; y dos de día neutro: (C) 'Fern' y (D) 'Selva'. Expresión relativizada a CORONA-LD en todos los casos y datos normalizados a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de al menos dos réplicas biológicas. Las letras representan las diferencias observadas mediante ANOVA de dos vías y Post-Hoc LSD de Fisher. Resultados del análisis estadístico en Apéndice 2 Tabla S5.

3.2.4 Análisis de la expresión de *FaFD2* durante el ciclo día/noche.

La expresión de *FaFD2* en hoja fue importante, siendo mayor en condiciones de SD que en LD en todos los cultivares analizados. Algunos de los genes implicados en el control de la floración, sufren cambios rítmicos de expresión, debidos al ritmo circadiano de luz/oscuridad, como el gen *CO* en *Arabidopsis* y *Vitis vinifera* (Suarez-López *et al.*, 2001; Almada *et al.*, 2009) o en la fresa cultivada (**Figura 11**). Por ello decidimos monitorizar la expresión de *FaFD2* a lo largo de todo un día, tanto en condiciones de SD como LD en dos

cultivares con distinto comportamiento frente al fotoperiodo: ‘Chandler’ (floración estacional o de SD) y ‘Selva’ (floración neutra o re-floreciente).

En fotoperiodo de LD, el comportamiento y los perfiles de expresión en ambas variedades fueron prácticamente idénticos (Figura 22B). En SD por el contrario, mientras ‘Chandler’ siguió un perfil de expresión parecido al de LD, el cultivar Selva mantuvo un mismo nivel de expresión a lo largo del día (Figura 22A). En general, las diferencias de expresión entre las distintas horas del día fueron modestas (\leq del doble) por lo que parece que este gen no sufre un importante control circadiano en su expresión.

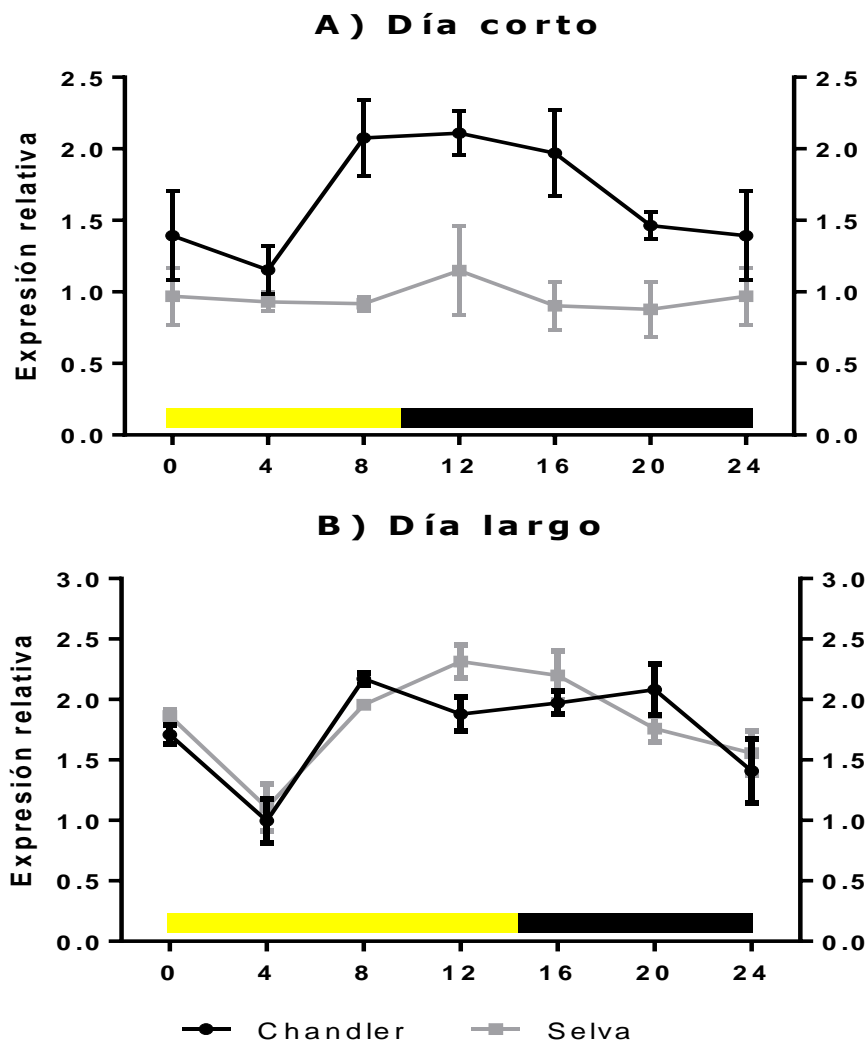


Figura 22. Patrón de expresión de *FaFD2* a lo largo del día en dos condiciones de fotoperiodo SD (A) y LD (B). Las muestras de hoja se tomaron cada cuatro horas, en tres réplicas biológicas con al menos 3 plantas cada una. La barra amarilla representa horas de luz y la negra oscuridad. El primer muestreo (0 h) se realizó al amanecer en ambos casos. Expresión relativizada independientemente para cada cultivar frente al muestreo trascurridas 4 horas y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar (n = 3).

3.2.5 Análisis de la sobre-expresión de *FaFD2* en 'Camarosa'.

Con el objetivo de conocer el papel que *FaFD2* pudiera tener en el control de la floración se generaron plantas transgénicas de fresa (*F. × ananassa* cv. Camarosa) mediante transformación estable mediada por *A. tumefaciens*. El gen *FaFD2* se expresó bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*. La construcción se llevó a cabo en el vector primario pBINPLUS con resistencia a Kanamicina y se usó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Tras la transformación de unos 200 discos de hoja y varios subcultivos en presencia del antibiótico, se obtuvo un elevado número de líneas transformantes independientes. Cada línea fue confirmada como transgénica mediante PCR sobre ADN genómico. De todos los transformantes obtenidos y confirmados se escogieron diez líneas y se las sometió a un periodo de aclimatación adecuado antes de pasarlas a tierra.

Una vez establecidas las líneas en el invernadero, se procedió a evaluar los niveles de sobre-expresión de *FaFD2* que presentaba cada línea. El muestreo se realizó sobre hoja tomada a las 12:00 de la mañana; recordemos que este gen no ve modificados significativamente sus niveles de expresión a lo largo del día. En la **Figura 23A** se representan los niveles de expresión de *FaFD2* mediante qRT-PCR en las diez líneas aclimatadas frente a las dos líneas control, Pgus2 y Pgus3 (*35S:GUS*). Las diez líneas transformantes presentaron niveles de *FaFD2* muy superiores, con expresiones más de 200 veces superiores a los controles en la mayoría de las líneas. La línea 13 fue la que presentó una menor expresión relativa de *FaFD2*, comparadas con el control, pero aun así fue 25 veces superior a este.

3.2.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).

Al tratarse de líneas que provienen de un largo proceso de transformación y multiplicación *in vitro* se procedió a evaluar los mismos caracteres que en la transformación anterior (ver apartado 3.1.5.1) con el objetivo de seleccionar las líneas con características más similares.

Durante el primer año de evaluación de las líneas *35S:FaFD2* no se observaron diferencias de crecimiento vegetativo mensurables con respecto a las líneas control. Todas las líneas presentaron un crecimiento normal y estolonaron de manera eficiente (**Figura 24**). A excepción de la línea 14, todas líneas *35S:FaFD2* florecieron antes que las líneas control (**Figura 23B**). En particular, las líneas 18 y 25 fueron extremadamente precoces, floreciendo 47 días antes que los controles. En general, las líneas transgénicas *35S:FaFD2* florecieron una media de 21 días antes que los controles. Si descartamos la línea 14, que floreció sensiblemente más tarde, las demás líneas transformantes florecieron 35 días antes como media.

Respecto al número total de flores producidas por las líneas transgénicas, la mayoría de ellas generaron un número similar de flores que la línea control P_{gus2}. Únicamente las líneas 3 y 23 produjeron un número sensiblemente mayor que los controles. También podemos observar como el número de flores durante el mes de Agosto apenas varió (Figura 23C).

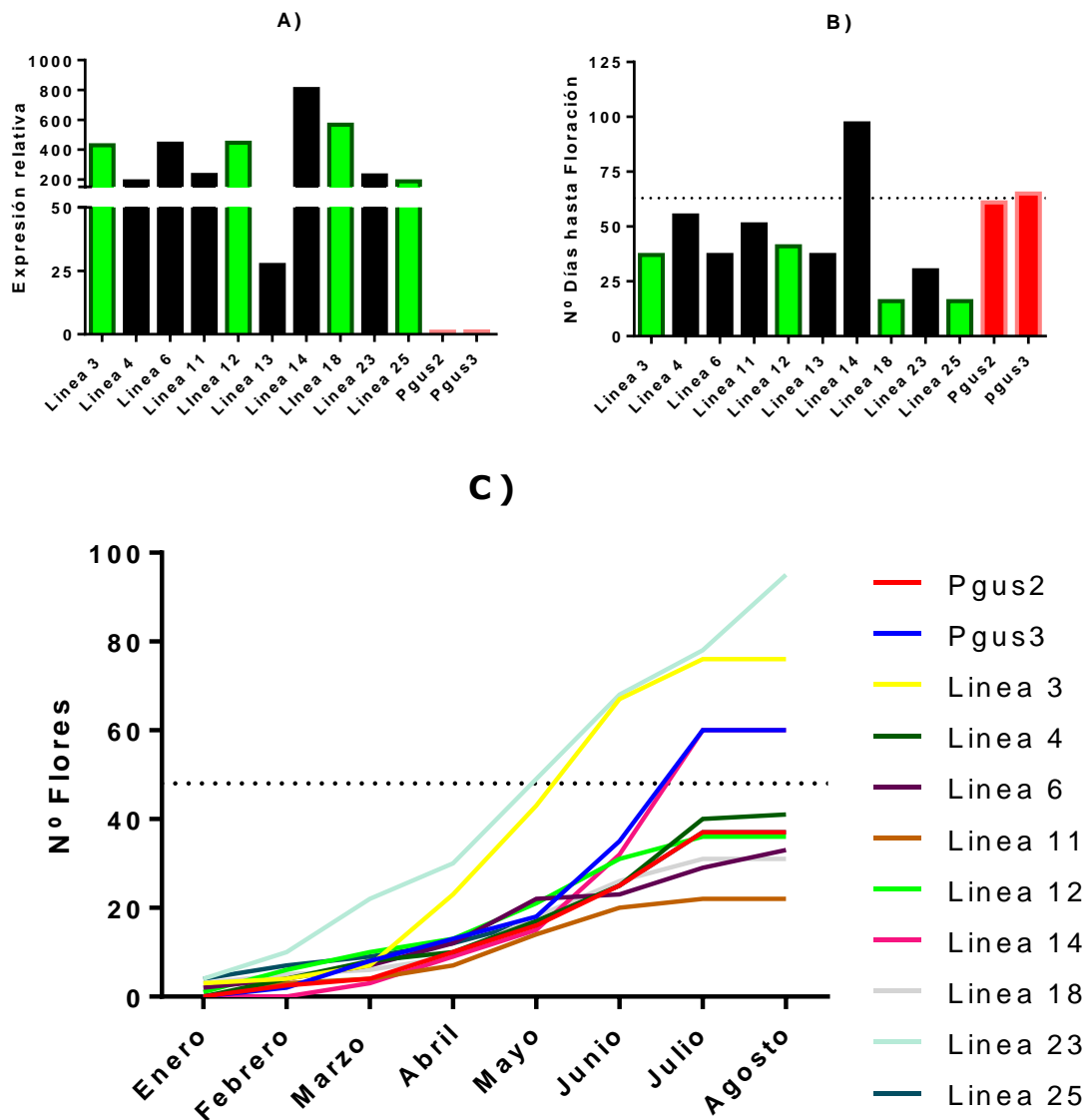


Figura 23. (A) Niveles de expresión de *FaFD2* en hoja en las líneas transgénicas *35S:FaFD2* en comparación con los controles, medidos mediante qRT-PCR. Barras en verde, líneas seleccionadas; barras en negro, líneas no seleccionadas y barras en rojo, líneas control. (B) Días hasta la primera flor visible de cada línea transgénica y los controles, medidos desde la finalización de la aclimatación. La línea de puntos representa la media de días hasta el inicio de la floración en las líneas control (63 días). (C) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de Enero hasta el 31 Agosto. La línea de puntos representa la media del número de flores producidas por los controles (48 flores).

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos durante la evaluación del periodo de floración, los niveles de sobre-expresión y su capacidad de estolonado, se decidió multiplicar vegetativamente las líneas 3, 12, 18 y 25 para proceder a un segundo año de evaluación fenotípica.



Figura 24. Fotos representativas de las líneas transgénicas *35S:FaFD2* en comparación con el control de transformación Pgus2 (tomado como referencia de las líneas control *35S:GUS*).

3.2.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).

En este segundo año de análisis se usaron cuatro líneas *35S:FaFD2*: línea 3, línea 12, línea 18 y línea 25 (ver apartado anterior). De cada línea se evaluaron 9 plantas (réplicas biológicas) obtenidas por multiplicación vegetativa a partir de estolones. Como controles se usaron 16 réplicas, 5 del control de P_{gus3} y 11 réplicas de la línea control P_{gus2} (ambos controles de transformación *35S:GUS*). Además se usaron 9 réplicas de ‘Camarosa’ (nombrada ‘Camarosa’ Wild type) que no sufrieron el proceso de transformación.

Durante la multiplicación vegetativa de las líneas, en los meses de Septiembre y Octubre, se produjo en el invernadero un brote importante de araña blanca (*Steneotarsonemus pallidus* Banks.). Las líneas transgénicas *35S:FaFD2* fueron las menos afectadas por la plaga, con interferencias únicamente al inicio y recobrándose antes de los efectos adversos de la plaga. No se llegó a perder ninguna réplica y todas las líneas pudieron ser evaluadas.

El seguimiento de las líneas comenzó en diciembre de 2014 y se extendió hasta inicios de septiembre del año 2015. A lo largo de esta campaña se tomaron datos de inicio de floración, para ver la precocidad de las líneas y se contó el número total de flores producidas por cada planta, para determinar si existe una mayor inducción de meristemas florales. Además se evaluaron otros efectos fenotípicos que pudieran afectar al desarrollo de la planta como su vigor y tamaño *de visu*, así como el inicio del estolonado. En la **Figura 25A** se representan los resultados obtenidos para el inicio de la floración. Dos líneas sufrieron un adelanto de la floración mientras que en otras dos no se observaron diferencias con el control de transformación (P_{gus2}+3). El adelanto en la floración de las líneas 3 y 18 fue bastante importante, 49 y 68 días respectivamente. Se da la circunstancia que la línea 18, ha sido la línea más precoz en ambos años de evaluación, de todas las transformaciones. Al igual que en el caso de la transformación *35S:FaCO*, no existieron diferencias significativas en el número de flores producidas (**Figura 25B**), ni en la fecha de inicio del estolonado (**Figura 25C**) ni en el número de estolones producidos por las líneas transgénicas (**Figura 25D**).

En la temporada anterior las cuatro líneas *35S:FaFD2* evaluadas sufrieron un adelanto en su floración (**Figura 23B**), sin embargo en este segundo año las líneas 12 y 25 no adelantaron su floración. Es llamativo el comportamiento de la línea 25, que fue bastante precoz el año anterior, no encontrándose diferencias significativas este año.

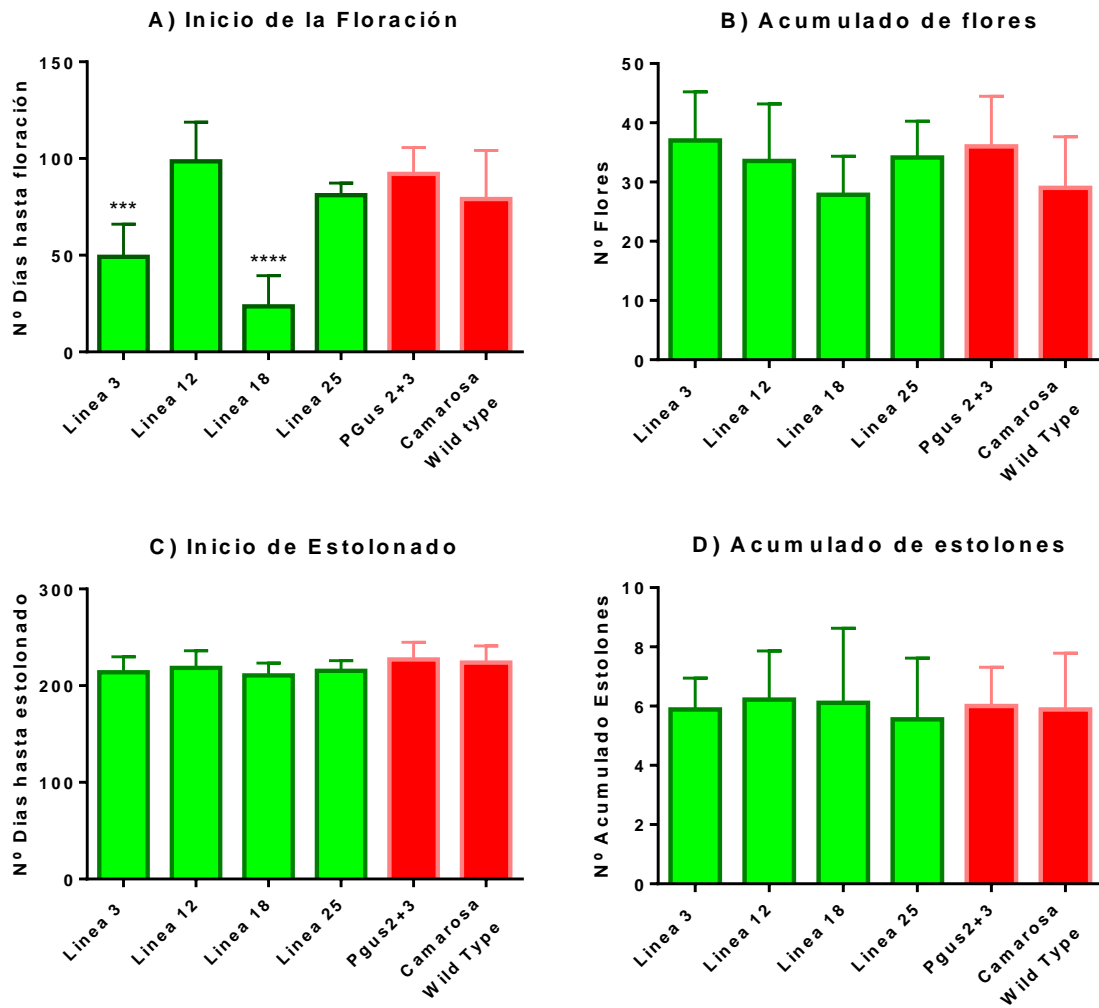


Figura 25. (A) Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas *35S:FaFD2* (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). (B) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de diciembre hasta el 3 de septiembre. (C) Número de días transcurridos hasta la aparición del primer estolón. (D) Número de estolones producidos por cada línea durante el estolonado. Los asteriscos representan diferencias significativas entre Pgus2+3 y las líneas transgénicas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.**

3.2.5.3 Evaluación en el Tercer año (2016).

Durante el verano las líneas transgénicas fueron multiplicadas de nuevo mediante estolones para su evaluación durante un tercer año. De las tres líneas se han evaluado nueve plantas, del control de transformación P_{gus2+3} se han evaluado 20 plantas y del control de 'Camarosa' Wild type otras 22. Aunque la transformación *35S:FaFD2* se vio menos afectada que las otras por la plaga de araña blanca, la línea 12 sufrió bastante durante el verano y no pudo ser multiplicada para su evaluación durante este tercer año. Al igual que en el año anterior, la evaluación de las líneas comenzó en Diciembre.

Al igual que ocurre con la transformación *35S:FaCO* todas las líneas sufrieron un retraso en su floración con respecto a los controles, siendo significativo este en el caso de la línea 3 (**Figura 26**). Tanto la línea 3 como la 18, vieron adelantada su floración el año anterior, floreciendo 49 y 23 días (respectivamente) después de su plantación en macetas. Este año, ambas líneas han sufrido un retraso de 30 días con respecto al anterior, eso unido al adelanto de 37 días sufrido por las líneas P_{gus2+3} hace que los resultados no se repitan en este tercer año. Durante esta campaña, pese a los intentos por erradicar la araña blanca, la línea 18 se ha visto bastante afectada, lo que puede haberla debilitado y por tanto retrasado su floración, ya que durante los dos años anteriores se había comportado como la línea con una floración más precoz entre todas las líneas que componen el experimento.

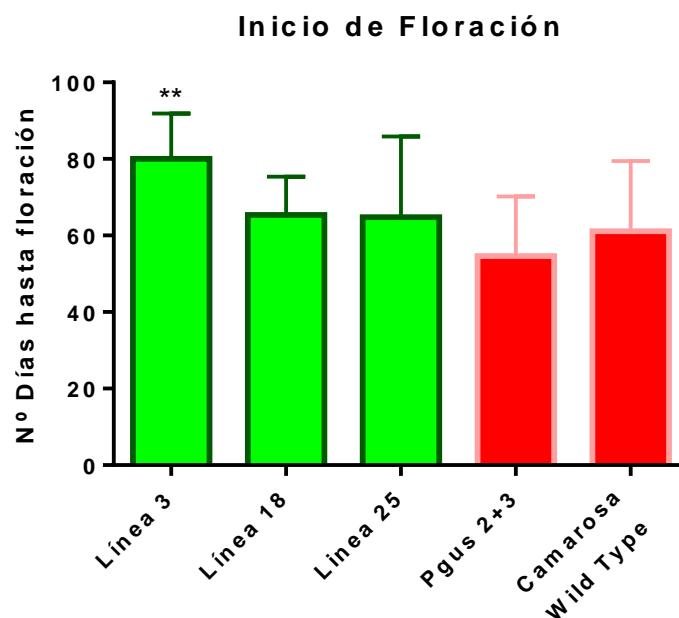


Figura 26. Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas *35S:FaFD2* (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). Los asteriscos representan diferencias significativas entre P_{gus2+3} y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.

3.3 Caracterización de genes de la subfamilia de factores de transcripción MADS tipo MICK^C en *Fragaria × ananassa*

En *Arabidopsis* los genes MICK y en concreto los MICK^C tienen funciones muy diversas, interviniendo en procesos tan dispares como el desarrollo de la raíz (Tapia-López *et al.*, 2008), la semilla (Kohler *et al.*, 2005) y el endospermo (Bemer *et al.*, 2008). Actúan como reguladores de ciclo celular y el destino meristemático (Gu *et al.*, 1998; Ferrandiz *et al.*, 2000; Melzer *et al.*, 2008). Algunos son genes homeóticos, integrantes del Modelo ABCDE responsables del desarrollo y formación de los órganos florales (Yanofsky *et al.*, 1990; Jack *et al.*, 1992; Mandel y Yanofsky, 1998; Ditta *et al.*, 2004). Por último, existen algunos que intervienen en la inducción e inicio de la floración (Adamczyk *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008). Dentro de este grupo se encuentran *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (*SOC1*; Lee y Lee, 2010; Moreno-Risueño *et al.*, 2010) y *AGAMOUS LIKE 6* (*AGL6*; Koo *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2011), en los que nos hemos centrado para este estudio en fresa. Con el objetivo de dilucidar su papel en la floración de la fresa y usando los genes ya descritos de *Arabidopsis*, buscamos los genes homólogos, mediante BLASTN, usando el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) y bases de datos para otras especies como manzana (Yao *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 1999), melocotón (Tani *et al.*, 2009) o uva (Díaz-Riquelme *et al.*, 2008). El árbol filogenético de la **Figura 27** muestra las relaciones evolutivas existentes entre las proteínas MICK^C descritas en *Arabidopsis* y sus respectivas homólogas en otras especies, centrándonos en las subfamilias implicadas en el inicio de la floración y/o el desarrollo floral ya que los genes pertenecientes al grupo MICK^C se dividen a su vez en varias subfamilias (Smaczniak *et al.*, 2012). En el genoma de *F. vesca* se encontraron 26 genes ortólogos pertenecientes a todas las subfamilias de genes MICK^C, excepto en la subfamilia FLC.

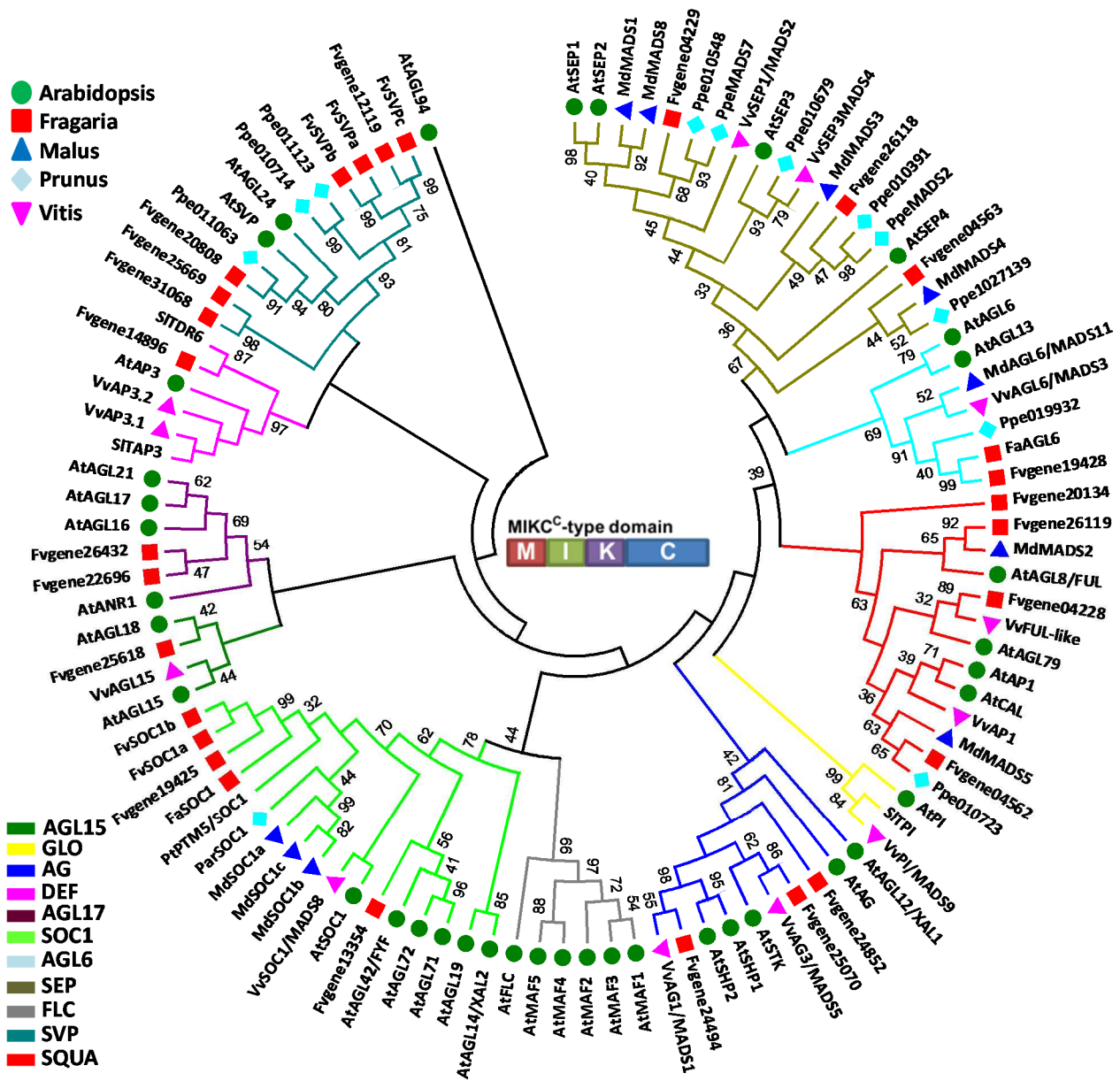


Figura 27. Árbol filogenético de factores de transcripción MADS tipo MICK^C relacionados con floración. Puntos verdes, proteínas de *Arabidopsis*. En rojo, proteínas homólogas de *Fragaria*. En azul, proteínas homólogas en *Malus doméstica*. Celeste, proteínas homólogas *Prunus*. Rosa, proteínas homólogas de *Vitis vinifera*. *AtAGL94* usado como grupo externo. Obtenido mediante Neighbor-joining en el programa Mega 5, 1000 réplicas Bootstrap, se muestra únicamente la topología. Números de acceso en apéndice 1 Tabla S3.

3.3.1. Caracterización de *SUPPRESSOR OF THE OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (*FaSOC1*) en *Fragaria* × *ananassa*.

3.3.1.1 Identificación del ortólogo de *SOC1* en la fresa cultivada.

Al realizar una búsqueda mediante BLASTN usando la secuencia de *SOC1* de *Arabidopsis* sobre el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) y las bases de datos del NCBI identificamos cuatro secuencias con similitudes a *AtSOC1*. Dos de ellas se tratan de predicciones sobre la secuenciación del genoma de *F. vesca* (*gene19425-v1.0-hybrid* y *gene13354-v1.0-hybrid*) las otras dos se tratan de secuencias nucleotídicas remitidas al NCBI, *FvSOC1a* (NCBI ID: FJ531999; Mouhu *et al.*, 2009) y *FvSOC1b* (NCBI ID: JF806634). Basándonos en los porcentajes de similitud que presentan entre sí (superiores al 98%) las secuencias *gene19425-v1.0-hybrid*, *FvSOC1a* y *FvSOC1b*, se debe tratar de alelos de un mismo gen. Estos a su vez presentan un porcentaje de similitud significativamente más bajo (del 58,8%) con respecto al gen *gene13354-v1.0-hybrid*. *AtSOC1* presenta porcentajes de similitudes sensiblemente diferentes, 66,7% frente al *gene19425* y 57% frente al *gene13354*. A la vista de estos porcentajes de similitud, se decidió realizar el clonaje sobre la secuencia con mayor similitud a *AtSOC1*, el gen *gene19425-v1.0-hybrid* (ver Material y Métodos, apartado 2.3 **Tabla 5**).

El Clonaje se realizó sobre el cultivar de día neutro ‘Selva’. Se obtuvo un ORF de 648 bp, que codificaría para una proteína de 215 aa, con un peso teórico de 25,02 KDa y un PI deducido de 8,48. *FaSOC1* presenta un porcentaje de similitud del 99 % con su homólogo en *F. vesca*, *FvSOC1a* (NCBI ID: FJ531999; Mouhu *et al.*, 2009). Los porcentajes de identidad con otras especies de la familia rosáceas fueron elevados: 79 y 77 % con *Prunus armeniaca* y *Malus domestica*, respectivamente, presentando similares resultados con *Vitis vinifera* (72 %), *Populus tremuloides* (74 %) y *Arabidopsis* (67 %). Con el fin de investigar las relaciones evolutivas existentes entre *FaSOC1* y otras proteínas homólogas se realizó un árbol filogenético (**Figura 28**). Las proteínas *SOC1* formaron clados distintos según provengan de especies monocotiledóneas o dicotiledóneas. Como era esperable, *FaSOC1* se localizó en el clado de las dicotiledóneas, junto con sus ortólogos dentro de la familia de las Rosaceae. En el alineamiento múltiple de *FaSOC1* con otras proteínas homólogas se puede observar una alta conservación de los dominios MADS y Keratin-like (**Figura 29**). A su vez se puede observar un dominio Intervening menos conservado y un dominio C-terminal más variable entre especies. Aun así, en el extremo 3’ nos encontramos un dominio específico de *SOC1*, compuesto por once aminoácidos conservados en su totalidad en las secuencias del género *Fragaria*. Además, sobre la secuencia encontramos conservados residuos relacionados con la localización celular, fosforilación y glucosilación de la proteína (Lei *et al.*, 2013) (**Figura 29**). Estos resultados indican que *FaSOC1* es un

integrante de la familia MICK^C y que posiblemente se trata del gen ortólogo a *AtSOC1* en la especie *F. × ananassa*.

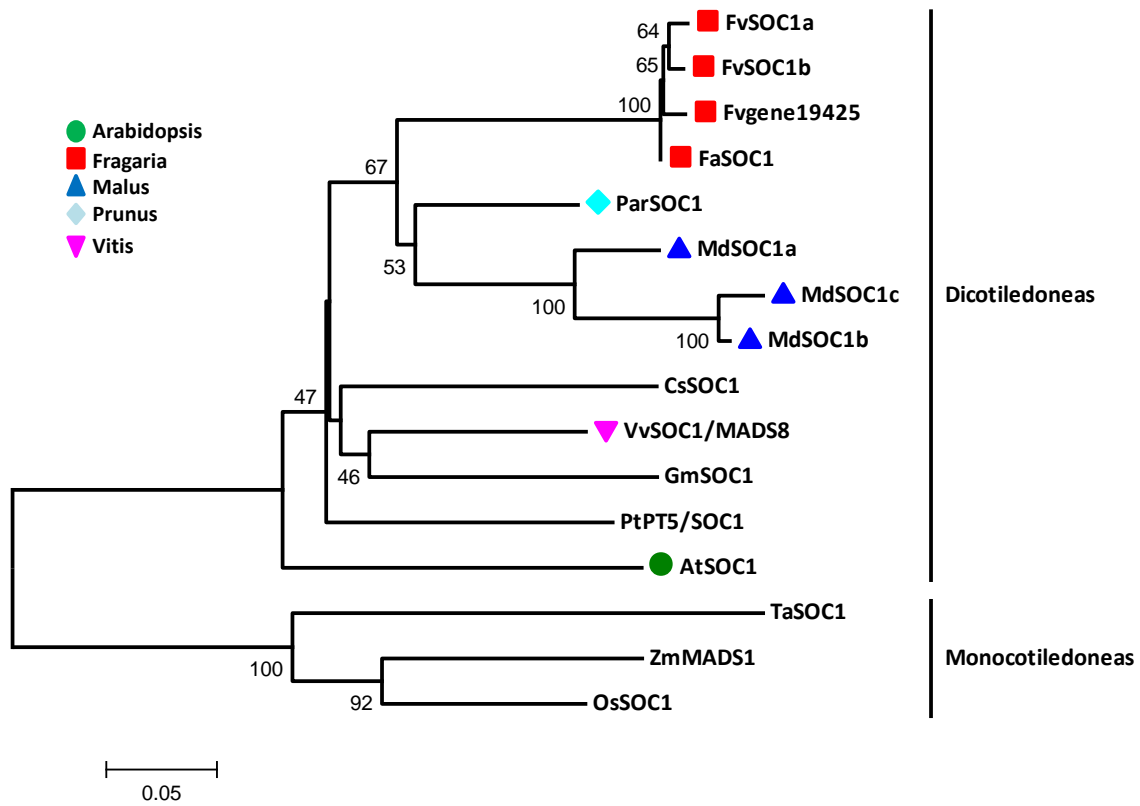


Figura 28. Árbol filogenético de proteínas pertenecientes a la subfamilia MICK^C de SOC1. En verde, proteínas de *Arabidopsis*. En rojo, proteínas homólogas de *Fragaria*. En azul, proteínas homólogas de *Malus doméstica*. Celeste, proteínas homólogas en *Prunus*. Rosa, proteínas homólogas en *Vitis vinifera*. Obtenido mediante el método neighbor-joining en el programa Mega v5.1, 1000 réplicas Bootstrap. Números de acceso en apéndice 1 Tabla S3.

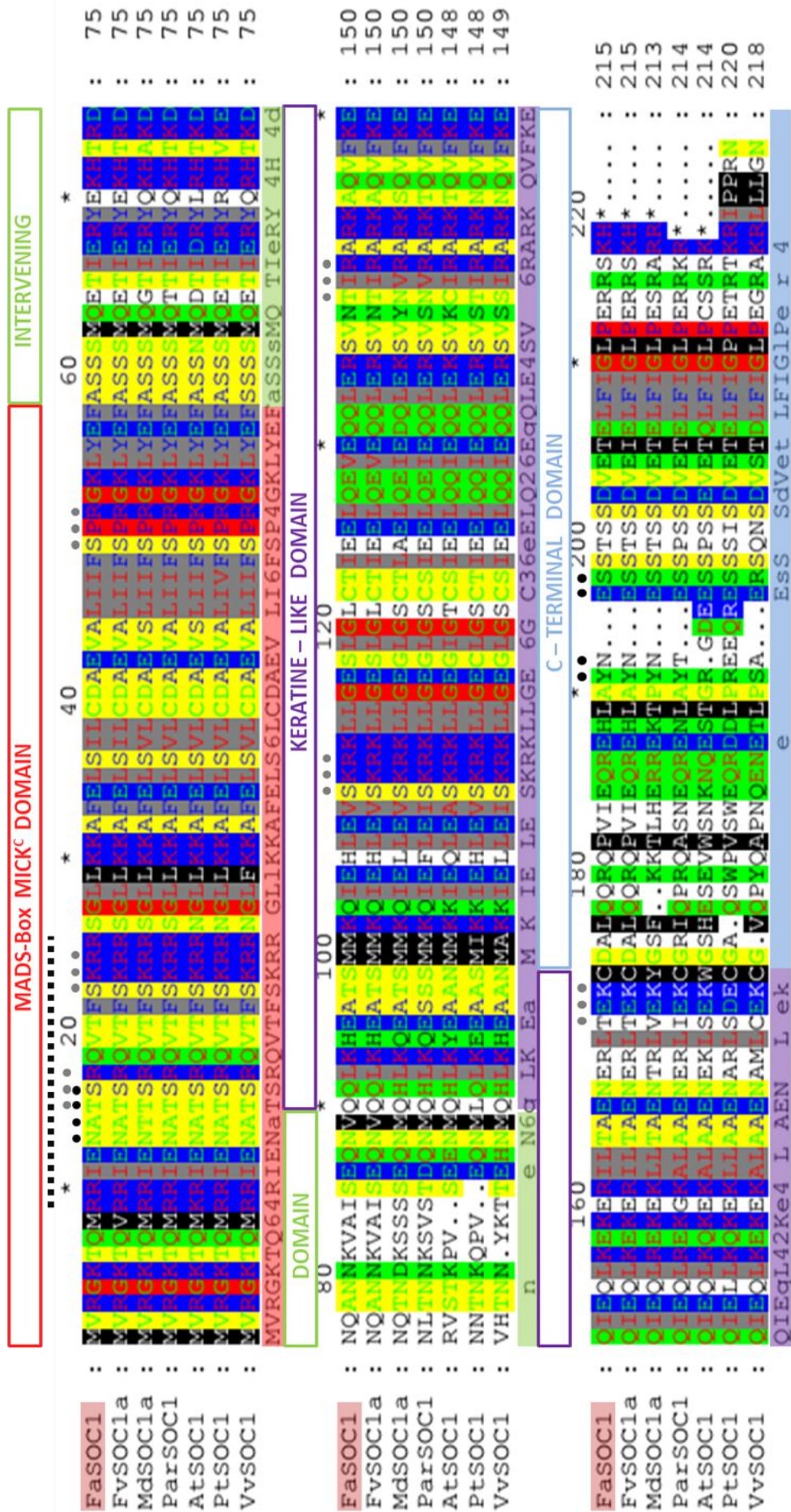


Figura 29. Alineamiento múltiple (ClustalW) de la secuencia de aminoácidos de FaSOC1 junto a proteínas homólogas de otras especies. Sobre el alineamiento se marcan los dominios que caracterizan a la Familia MICK^c: dominio MADS en rojo; Intervening en verde; Keratine-like en morado y C-terminal en celeste. Dominio SOC1 marcado por flecha. La línea discontinua señala la posición potencial de una señal de localización celular de la proteína. Puntos en negro marcan regiones PKC, relacionadas con fosforilación. Puntos grises marcan posición de residuos susceptibles de glucosilación.

3.3.1.2 Diferencias en la expresión de *FaSOC1* entre distintos órganos.

Para determinar el papel que ejerce *FaSOC1* en la fresa cultivada, se analizó su expresión en diferentes órganos del cultivar 'Chandler' (Figura 30). Las muestras de ARN se extrajeron de hojas, raíz y corona, en condiciones de SD y en flor cerrada, fruto verde, blanco y rojo, durante la primavera. Los niveles más altos de expresión se detectaron en raíz y hoja, siendo aproximadamente la mitad en la corona. En órganos reproductores, los niveles más altos de expresión se localizaron en la flor, y disminuyendo conforme avanza la formación y maduración del fruto. La

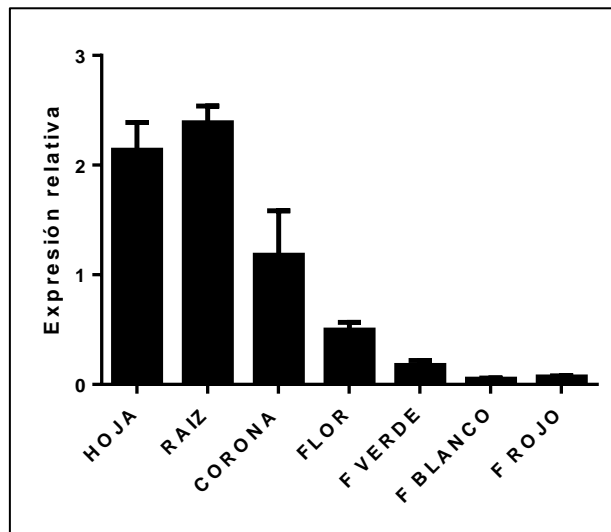


Figura 30. Expresión relativa de *FaSOC1* en los distintos órganos de 'Chandler'. Relativizados a la expresión en corona y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes ($n = 3$).

elevada expresión obtenida en hoja y raíz, nos indica que *FaSOC1* podría realizar en fresa otras funciones (o funciones complementarias) a las que realiza en *Arabidopsis*. Durante la realización de esta tesis, el gen *FvSOC1* de *F. vesca* ha sido caracterizado por el grupo del Dr. T. Hytönen y han comprobado que a diferencia de *AtSOC1*, *FvSOC1* promueve el crecimiento vegetativo y reprime la floración en esta especie (Mouhu *et al.*, 2013). Sería de esperar que en *F. × ananassa* realizara funciones parecidas, dado el grado de parentesco tan alto entre ambas especies.

3.3.1.3 Diferencias de expresión de *FaSOC1* entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.

Con el objetivo de discernir si existen diferencias de expresión de *FaSOC1* entre distintos cultivares, se midieron los niveles de expresión en los cuatro cultivares analizados previamente para los genes *FaCO* y *FaFD2*, con floración estacional de día corto en 'Chandler' y 'Parker', y de día neutro en 'Selva' y 'Fern'. La expresión de *FaSOC1* se analizó tanto en condiciones de SD como de LD. Basándonos en los resultados previos (Figura 30), los niveles de expresión se estimaron mediante qRT-PCR en hoja, corona y raíz, aunque los tejidos implicados en la inducción de la floración sean principalmente las hojas y los meristemos.

En la **Figura 31** se representan los niveles de expresión relativa de *FaSOC1* obtenidos en condiciones SD (en negro) y LD (representado en gris), en los cuatro cultivares en estudio. Como podemos observar la expresión de *FaSOC1* fue siempre significativamente mayor en condiciones de LD en todos los tejidos, y en las cuatro variedades, tanto las de día corto como las de floración neutra. El único caso en el que las diferencias no fueron significativas estadísticamente fue en la raíz de 'Fern' (**Figura 31C**).

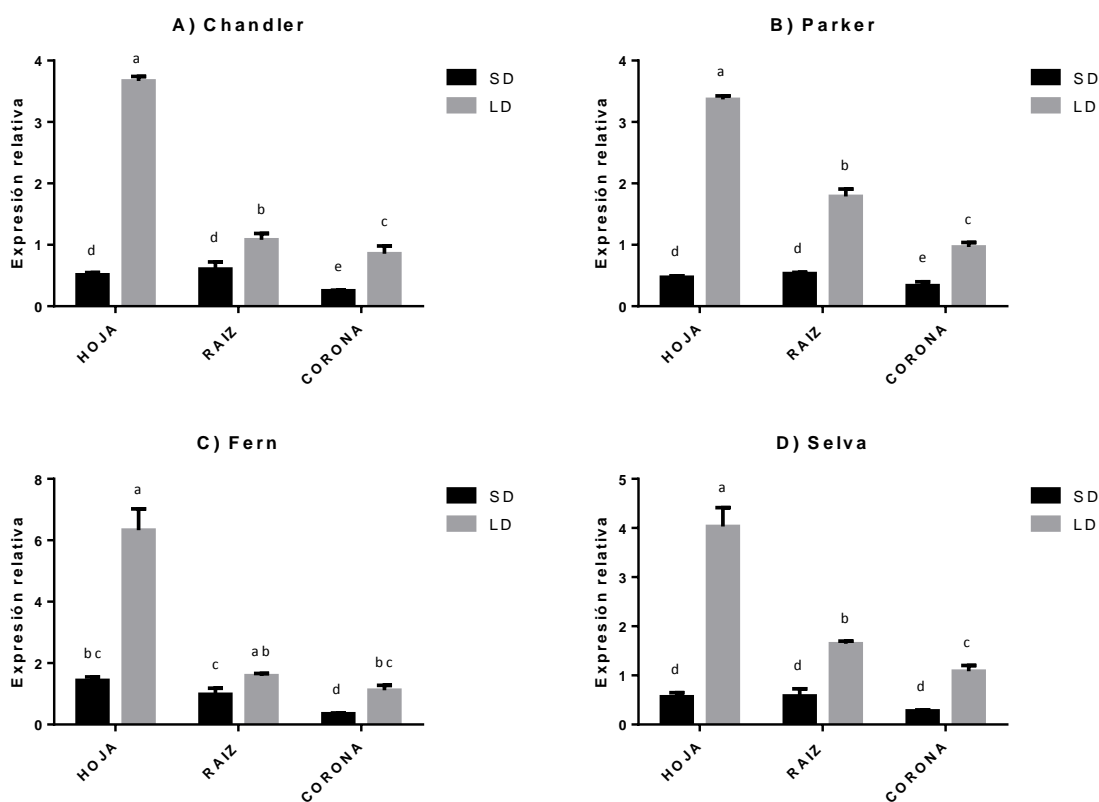


Figura 31. Expresión relativa de *FaSOC1* bajo condiciones de fotoperiodo de SD (barra en negro) y LD (barra en gris), para cuatro cultivares distintos: dos de día corto (A) 'Chandler' y (B) 'Parker'; y dos de día neutro: (C) 'Fern' y (D) 'Selva'. Expresión relativizada a CORONA-LD en todos los casos y datos normalizados a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de al menos dos réplicas biológicas. Las letras representan las diferencias observadas mediante ANOVA de dos vías y Post-Hoc LSD de Fisher. Resultados del análisis estadístico en Apéndice 2 Tabla S6

3.3.1.4 Análisis de la expresión de *FaSOC1* en relación con el ritmo circadiano.

Como se puede observar en la **Figura 30**, *FaSOC1* tiene una importante expresión en hoja. Algunos de los genes implicados en el control de la floración, sufren cambios rítmicos de expresión, debidos al fotoperiodo como el gen *CO* en *Arabidopsis* y *Vitis vinifera* (Suarez-López *et al.*, 2001; Almada *et al.*, 2009) y también en la fresa cultivada (**Figura 11**). Por ello decidimos monitorizar la expresión de *FaSOC1* a lo largo del día, tanto en condiciones de fotoperiodo de SD como LD, y en dos cultivares con distinto comportamiento frente al fotoperiodo: ‘Chandler’ (floración estacional de SD) y ‘Selva’ (de floración neutra).

En la **Figura 32** podemos ver como los perfiles de expresión de ambas variedades fueron muy similares entre ellas tanto en LD como en SD. Como se observó en la **Figura 31**, la expresión de *FaSOC1* en ‘Chandler’ y ‘Selva’ en LD es unas 8 veces mayor que en SD, lo que implica que las variaciones observadas a lo largo del día son por tanto menores en este fotoperiodo (**Figura 32A**). En LD, aunque también existió poca variación, se puede observar una tendencia de *FaSOC1* a incrementar la expresión durante la noche y disminuir durante el día. También se puede observar que las diferencias de expresión relativas a lo largo del día oscilaron $\pm 0,5$ veces con respecto a la expresión del muestreo transcurridas 16 horas, que se fijó en 1. Estas diferencias de expresión son por tanto limitadas y podemos concluir que la expresión de este gen en hoja no parece estar controlada en gran medida por el ritmo circadiano.

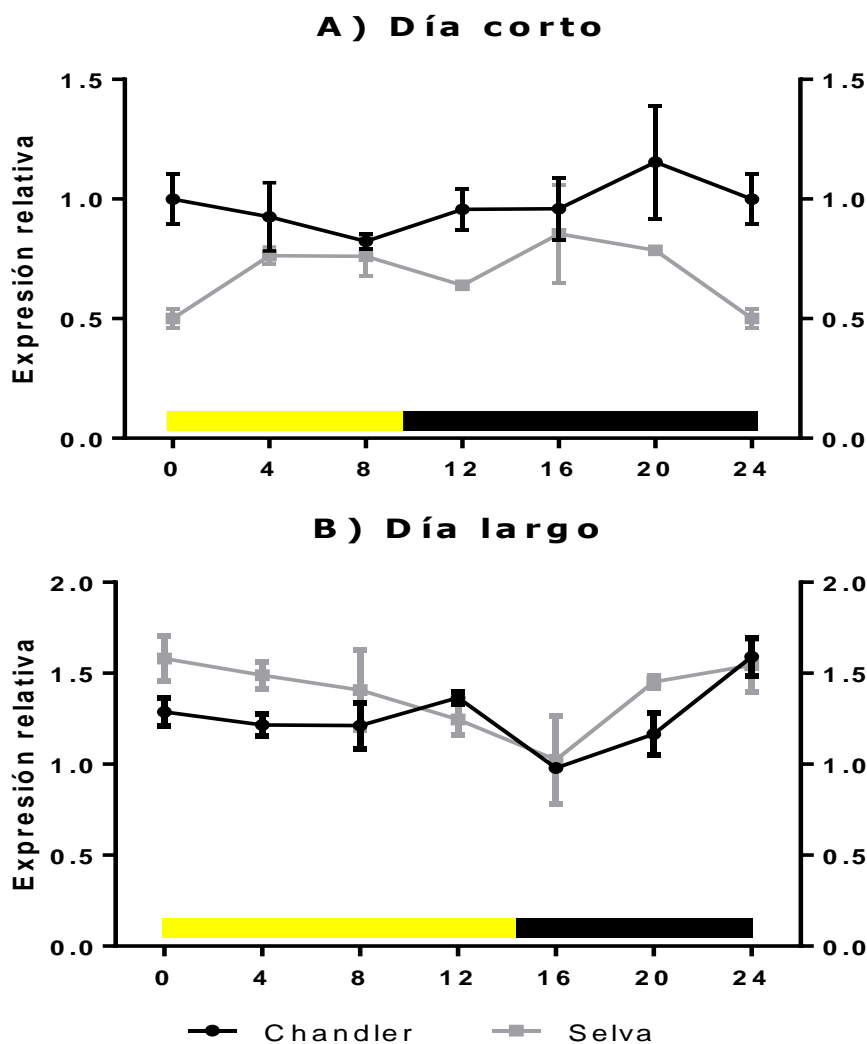


Figura 32. Patrón de expresión de *FaSOC1* a lo largo del día en dos condiciones de fotoperiodo SD (A) y LD (B). Las muestras de hoja se tomaron cada cuatro horas, en tres réplicas biológicas con al menos 3 plantas cada una. La barra amarilla representa horas de luz y la negra oscuridad. El primer muestreo (0h) se realizó al amanecer en ambos casos. Expresión relativizada independientemente para cada cultivar frente al muestreo trascurridas 16 horas y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

3.3.1.5 Análisis de la sobre-expresión de *FaSOC1* en 'Camarosa'.

Para tratar de conocer el papel de *FaSOC1* en la floración de la fresa cultivada, se generaron por transformación genética estable mediada por *A. tumefaciens* plantas transgénicas de fresa (*F. × ananassa* cv. Camarosa) que expresan este gen bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*. La construcción se llevó a cabo en el vector primario pBINPLUS con resistencia a Kanamicina y se usó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Tras la transformación de unos 200 discos de hoja y varios subcultivos en presencia del antibiótico selectivo, se obtuvieron un elevado número de líneas transformantes independientes. De todos los transformantes obtenidos y confirmados mediante PCR, se escogieron diez líneas transgénicas y se las sometió a un periodo de aclimatación adecuado antes de pasarlas a

tierra. Dos de las líneas transgénicas *35S:FaSOC1* murieron durante el proceso de aclimatación, así que la **Figura 33A** muestra los niveles de expresión mediante qRT-PCR de las 8 líneas restantes en comparación con los controles *Pgus2* y *Pgus3* (controles *35S:GUS*). El muestreo se realizó sobre hoja tomada a las 16:00 de la tarde. Recordemos que este gen no ve modificados sus niveles de expresión durante el día. Todas las líneas transformantes presentaron niveles de expresión muy superiores a los controles, de al menos 45 veces más, con excepción de la línea 1 que fue 15 veces superior al control *Pgus2*.

3.3.1.5.1 Evaluación en el Primer año (2014).

Al tratarse de líneas que provienen de un largo proceso de transformación y multiplicación *in vitro* se procedió a evaluar los mismos caracteres y de igual forma que para el gen *FaCO* (ver apartado 3.1.5.1).

Como podemos observar en la **Figura 33B**, la precocidad de la floración de las líneas *35S:FaSOC1* varió entre las distintas líneas transgénicas. Tres de ellas florecieron antes que los controles (líneas 6, 21 y 31) mientras que 4 líneas sufrieron un retraso considerable de la misma (líneas 3, 7, 9 y 20). La línea con más baja sobre-expresión (línea 1) floreció al mismo tiempo que los controles. Respecto al número total de flores producidas por las líneas transgénicas, también existió una alta variabilidad (**Figura 33C**). Es destacable el elevado número de flores producidas por las líneas 9 y 21. El bajo número de flores producidas por las líneas 20 y 7 pudo estar influenciado por su tardía entrada en floración. El caso de la línea 9 es curioso ya que encontrándose dentro del grupo que floreció más tarde, alcanzó un número acumulado de flores muy alto. Por último, podemos ver que las líneas con una sobre-expresión más modesta (líneas 1, 3 y 6), presentaron un número de flores similar a los controles.

Durante esta primera evaluación de las líneas *35S:FaSOC1* se puso de manifiesto un fenotipo particular, que posteriormente se evaluó durante el segundo año de estudio. Todas las líneas, a excepción de la línea 1 (la de menor sobre-expresión) presentaron este fenotipo que consistió en un elevado crecimiento vegetativo y un tamaño superior a los controles (**Figura 33A**, tabla anexada). Además, presentaron una acusada elongación del peciolo de la hoja, lo que les proporciona un aspecto erecto (**Figura 34**). Las inflorescencias, al igual que las hojas, presentaron un peciolo más largo y erecto que las plantas control. Esto hace que las inflorescencias se mantengan erguidas durante todo el desarrollo floral y parte de la maduración del fruto, doblándose únicamente por el peso de los mismos durante la maduración. Por último, presentaron una morfología floral diferenciada, caracterizada por ser flores muy compactas, con sépalos grandes y pétalos pequeños y juntos (**Figura 34A, B y C**). La línea 20, la de mayor sobre-expresión es la que presentó un fenotipo más acusado. Esta línea presenta un porte muy elevado, con menor número de

hojas que los controles y con de peciolos largos. Además, esta línea transgénica estolonó antes de florecer. Respecto del estolonado, todas las líneas fueron capaces de estolonar adecuadamente (igual a los controles). Algunas líneas transgénicas poseen una mayor capacidad de producción de estolones (línea 7, 20 y 21), llegando a producir el doble o más de estolones que los controles (**Figura 33A**, tabla anexada).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos durante el periodo de floración, los niveles de sobre-expresión y la capacidad para estolonar, se decidió multiplicar vegetativamente las líneas 7, 9, 20 y 21 (señaladas en verde en la **Figura 33A y B**) para proceder a un segundo año de evaluación fenotípica.

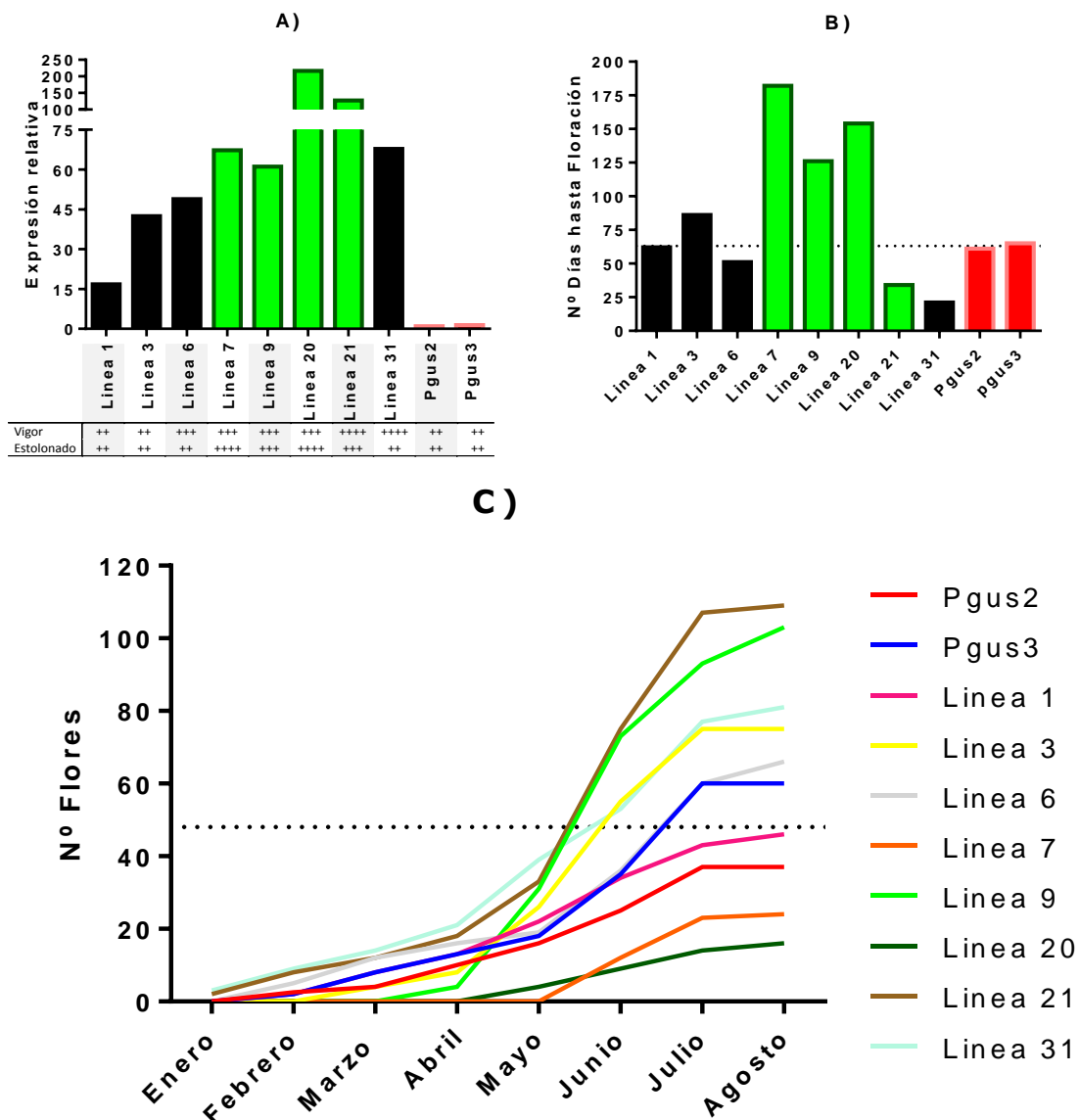


Figura 33. (A) Niveles de expresión de *FaSOC1* en las líneas transgénicas *35S:FaSOC1* (barras en verde y negro) en comparación con las líneas control (barras en rojo), medidos por qRT-PCR y relativizados al control pgus2. En la tabla adjunta se esquematiza el vigor y el estolonado de cada línea, aumentando ambos con el número de cruces, comparando con las líneas control (++ normal). (B) Días hasta la formación de la primera flor visible en cada línea transgénica y en los controles, medidos desde la finalización de la aclimatación. La línea discontinua representa la media de días hasta el inicio de la floración en las líneas control (63 días). (C) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de Enero hasta el 31 de Agosto. La línea discontinua representa el número medio de flores producidas por los controles (48 flores).



Figura 34. Fotos de líneas transgénicas 35S:FaSOC1 representativas en comparación con el control de transformación Pgus2 (tomado como referencia de las líneas control 35S:GUS). (A) y (B) Detalles de la morfología floral. (C) Detalles de la arquitectura de la inflorescencia .

3.3.1.5.2 Evaluación en el Segundo año (2015).

En este segundo año de análisis se usaron cuatro líneas *35S:FaSOC1*: línea 7, línea 9, línea 20 y línea 21 (ver apartado anterior). De cada línea se evaluaron 9 plantas (réplicas biológicas) obtenidas por multiplicación vegetativa. Como controles se usaron 16 réplicas, 5 del control de P_{gus3} y 11 de la línea control P_{gus2} (ambos control de transformación *35S:GUS*). Además se usaron 9 réplicas de 'Camarosa' (nombrada 'Camarosa' Wild type) que no han sufrido el proceso de transformación.

Durante la multiplicación vegetativa de las líneas, en los meses de septiembre y octubre, se produjo en el invernadero un brote importante de araña blanca (*Steneotarsonemus pallidus* Banks.) que afectó por igual a las madres y a los estolones de las líneas transgénicas de *35S:FaSOC1* en evaluación. Como consecuencia de ello, la mayoría de las plantas durante esta segunda campaña mostraban síntomas de la plaga. Al principio, meses de diciembre y enero, los síntomas eran evidentes, existiendo réplicas muy afectadas. Conforme fue avanzando el estudio, gracias a los sucesivos tratamientos, las plantas fueron mejorando paulatinamente, pero aun así varias réplicas murieron o no pudieron ser evaluadas correctamente. Concretamente en el caso de *35S:FaSOC1* la línea 7 fue la más afectada, con unos síntomas muy acusados que afectaron gravemente a su crecimiento, desarrollo y floración, por lo que no será tomada en cuenta en el análisis de los resultados. Además, la plaga mató una réplica de la línea 9.

El seguimiento de las líneas comenzó en diciembre de 2014 y se extendió hasta inicios de septiembre del año 2015. A lo largo de esta campaña se tomaron datos de inicio de floración, se contó el número total de flores producidas por cada planta, para determinar si existe una mayor o menor inducción de meristemas florales. Tres de las líneas escogidas (líneas 7, 9 y 20) para un segundo año florecieron más tarde que los controles, estolonaron más y relativamente pronto (la línea 20 antes incluso de florecer). Por ello en el segundo año se hizo hincapié en el control del inicio del estolonado y la producción de estolones de cada línea. Además, se procedió a estudiar en mayor detalle el fenotipo observado durante el primer año de evaluación (presente en la mayoría de las líneas) consistente en un crecimiento vegetativo mayor, una acusada elongación del peciolo de la hoja y la inflorescencia. Así mismo, las líneas *35S:FaSOC1* presentaron una morfología floral diferenciada, caracterizada por ser flores muy compactas, con sépalos grandes y pétalos pequeños y juntos. Para poder evaluar el fenotipo se procedió a medir la longitud del peciolo y de la inflorescencia, y la altura de cada planta tanto de las líneas *35S:FaSOC1* (exceptuando la línea 7, afectada de la plaga de araña blanca con unos síntomas tan acusados que distorsionaban su crecimiento normal, su tamaño y su morfología floral) como las líneas control (P_{gus2+3} y Camarosa Wild type).

En la **Figura 35A** se representa el inicio de la floración de cada línea, las líneas 9 y 20 florecieron al mismo tiempo que los controles, mientras que la línea 21 que sufrió un adelanto en su floración de 25 días (igual que el año anterior). En cuanto al número de flores producidas por cada línea, fue la línea 20 la que presentó diferencias significativas, con un acumulado de flores muy por debajo de los controles (18 frente a 36) **Figura 35B**, mientras que las otras dos presentaron un número similar de flores que los controles. En el caso del estolonado, se obtuvo un resultado homogéneo, todas las líneas presentaron un significativo adelanto en la producción de estolones (**Figura 35C**). Las líneas *35S:FaSOC1* también produjeron mayor número de estolones aunque las diferencias no fueron significativas (**Figura 35D**).

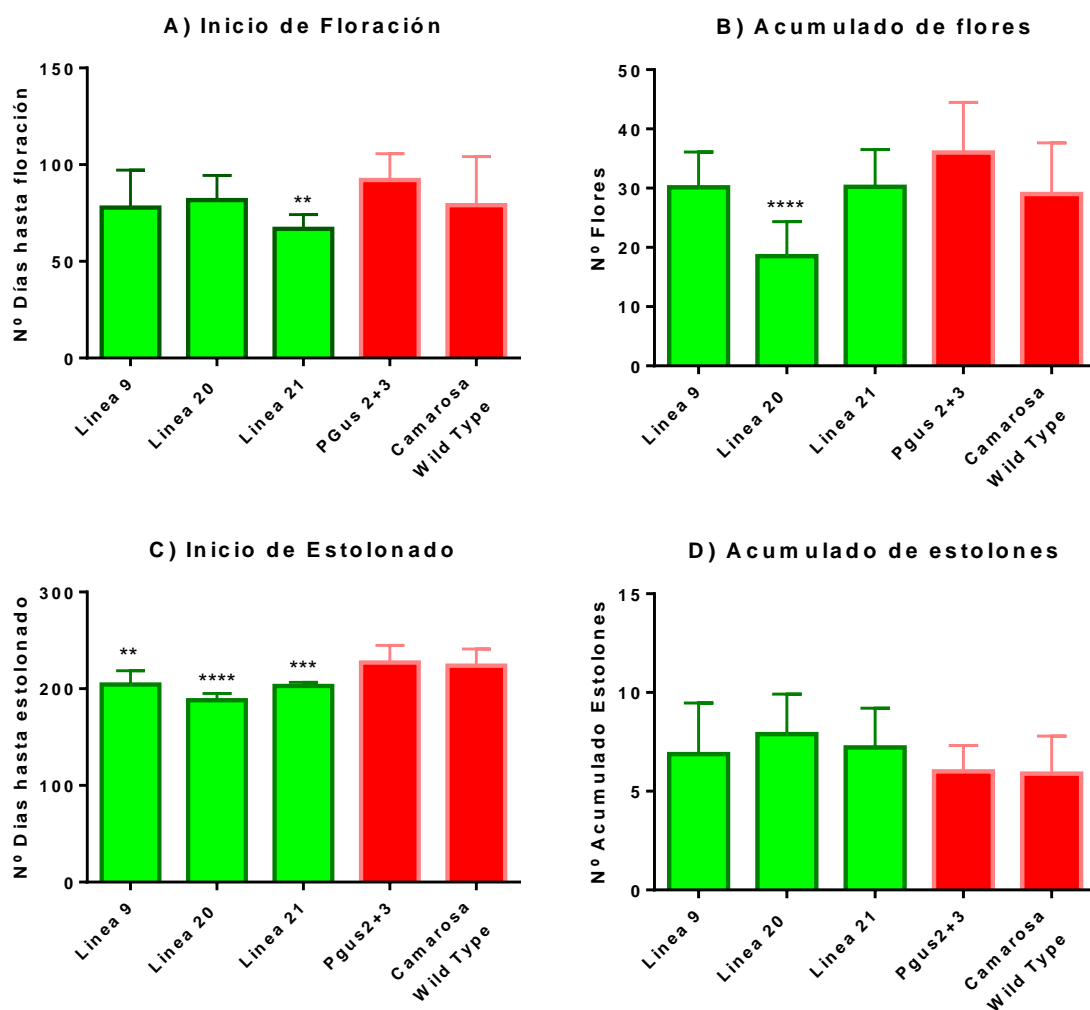


Figura 35. (A) Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas *35S:FaSOC1* (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). (B) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de diciembre hasta el 3 septiembre. (C) Número de días transcurridos hasta la aparición del primer estolón. (D) Número de estolones producidos por cada línea durante el estolonado. Los asteriscos representan diferencias significativas entre Pgus2+3 y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.**

En esta segunda temporada de estudio, se volvió a observar el fenotipo de elongación de peciolo e inflorescencias de la transformación *35S:FaSOC1* observado en el

año anterior en las líneas estudiadas: 9, 20 y 21. Este fenotipo fue de mayor intensidad en la línea con mayor sobre-expresión: línea 20 (**Figura 33A**). En la **Figura 36A** se puede observar como el peciolo de las hojas de las tres líneas *35S:FaSOC1* fue significativamente más largo que el de las líneas control. Con la longitud de la inflorescencia ocurre igual, las tres líneas poseen inflorescencias significativamente más largas (**Figura 36B**). La altura total de la planta de las líneas 20 y 9 fue significativamente mayor que los controles, no encontrándose diferencias significativas en la línea 21. El resultado en la línea *35S:FaSOC1* 21 pudiera en parte estar influenciado por una mayor incidencia de la plaga sobre esta línea (**Figura 36C**).

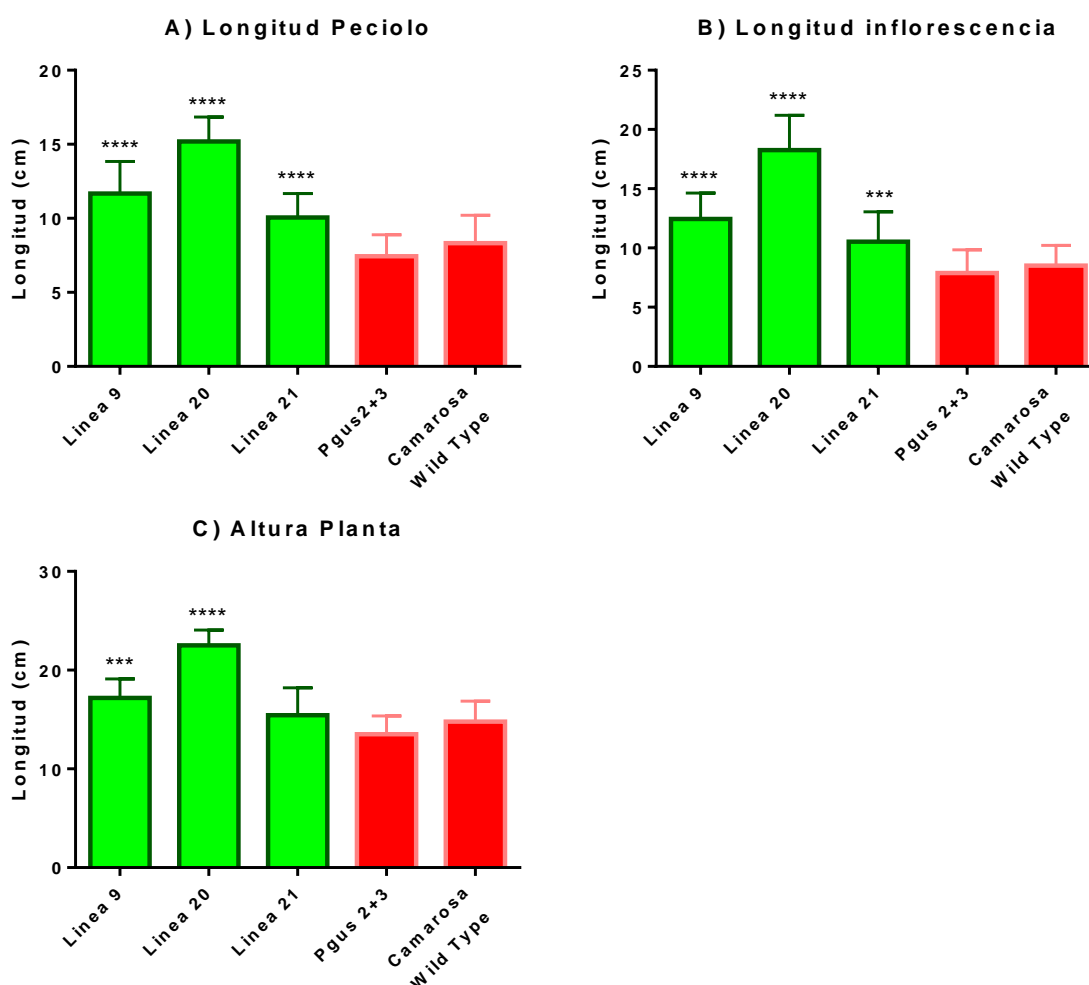


Figura 36. (A) Longitud del peciolo de la hoja medido en centímetros; n=30. **(B) Longitud de la inflorescencia**, medido en centímetros; n=30. **(C) Altura de cada línea**, medido en centímetros. Los asteriscos representan diferencias significativas entre Pgus2+3 y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.

El fenotipo floral observado en las líneas *35S:FaSOC1* en el primer año, con flores muy compactas, con sépalos grandes y pétalos pequeños y juntos, se repitió en el segundo año de estudio (**Figura 37C, D y E**) en las tres líneas analizadas: 9, 20 y 21. Al igual que el año anterior, la línea 20 fue la que presentó el fenotipo más acusado de las tres, llegando

incluso a estolonar y florecer a la vez, teniendo un porte muy esbelto, con producción de menor número de hojas que los controles y una altura de la planta significativamente mayor **Figura 37**. Las plantas de la línea 21 presentaron una altura similar a los controles aunque se puede observar como los peciolo de las hojas son ligeramente más largos que los del control (**Figura 37**).

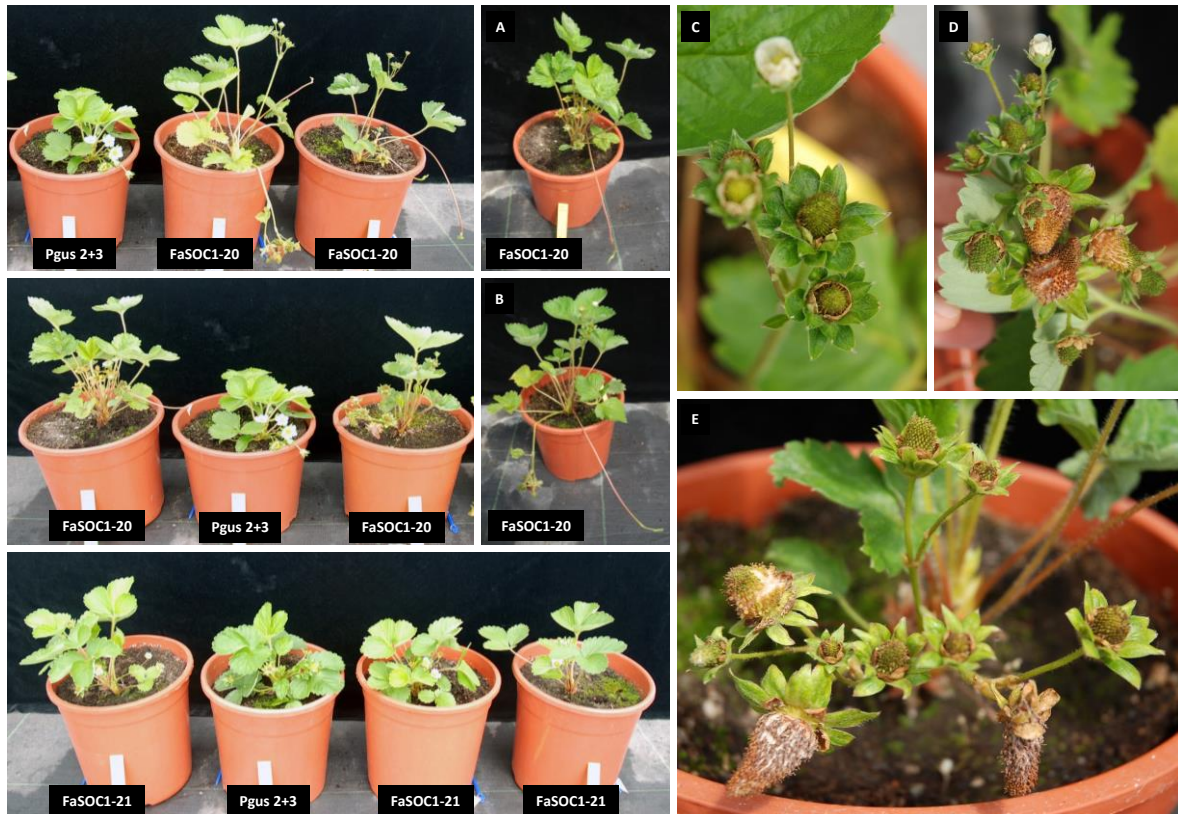


Figura 37. Fotos de líneas transgénicas *35S:FaSOC1* representativas en comparación con el control de transformación PguS 2+3. **(A)** Detalle de clon de la línea 20, con inflorescencia erecta y un estolón a la vez. **(B)** Detalles de clon de la línea 20 con una inflorescencia con frutos maduros que terminan por doblar la inflorescencia, a la vez que la planta estolona. **(C)** Detalle de la morfología floral. **(D y E)** Detalles de la arquitectura de la inflorescencia con frutos secos antes de completar su maduración.

Durante esta segunda campaña también se observó que la mayoría los frutos de las líneas *35S:FaSOC1* fueron más pequeños que los de los controles, fundamentalmente reduciéndose el diámetro transversal, lo que originaba frutos pequeños y alargados, que en general no maduraban a un fruto carnoso, sino llegando incluso a secarse unidos a la inflorescencia (**Figura 37D y E**). Pocos frutos alcanzaron la coloración roja madura en las líneas *35S:FaSOC1*, únicamente en la línea 21 observamos algunos frutos con una maduración normal (aunque de menor tamaño que los controles).

3.3.1.5.3 Evaluación en el tercer año (2016).

Durante el verano las líneas transgénicas fueron de nuevo multiplicadas mediante estolones para su evaluación durante un tercer año. De las tres líneas se han evaluado diez plantas, del control de transformación P_{gus2+3} se han evaluado 20 réplicas y del control de 'Camarosa' otras 22 plantas. Al igual que en el año anterior, la evaluación de las líneas comenzó en Diciembre.

En la **Figura 38A** se puede observar como todas las líneas transgénicas mostraron un retraso en la floración durante este tercer año, siendo muy significativo en el caso de la línea 9 y la línea 20. Una vez más, lo que ha marcado la diferencia respecto del año anterior fue la precocidad mostrada por los controles, ya que las tres líneas de *35S:FaSOC1* (9, 20 y 21) florecieron transcurridos aproximadamente los mismos días que el año anterior (80 frente a 78, 85 frente a 81 y 69 frente a 67; respectivamente). Por lo tanto, la sobre-expresión de *FaSOC1*, no solo retrasó la entrada en floración de las líneas transgénicas sino que afectó al estolonado (al igual que en el año anterior **Figura 35C y D**). Concretamente la línea 20, estolonó antes de entrar en floración (hecho que se ha repetido en los tres años de evaluación), mientras los controles florecían, ya que esto ocurrió a finales de Diciembre cuando las condiciones ambientales son de SD (**Figura 38B**). Al igual que en las otras dos campañas, la sobre-expresión de *FaSOC1*, estimuló el crecimiento vegetativo. Esto se traduce en plantas más vigorosas que los controles, con mayor altura debido a una mayor elongación de peciolo de la hoja y al alargamiento de las inflorescencias, hecho que se comprobó estadísticamente en el año anterior (**Figura 36A, B y C**) y que se puede observar

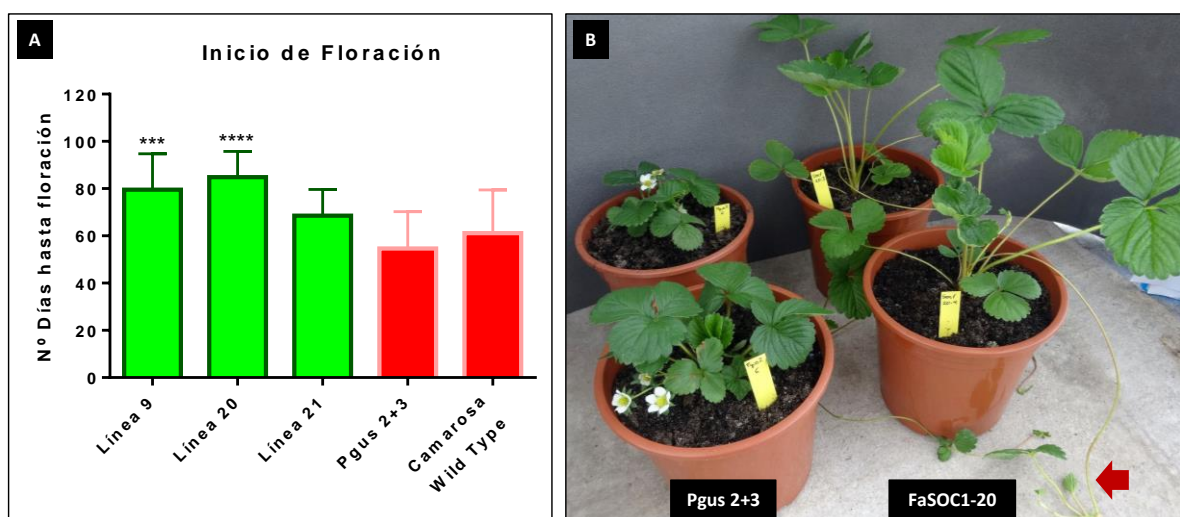


Figura 38. (A) Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas *35S:FaSOC1* (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). Asterisco representa diferencias significativas entre P_{gus2+3} y líneas transgénicas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ANOVA Post-Hoc de Dunnett. (B) Detalle del estolonado de plantas línea 20 *35S:FaSOC1* (flecha roja) en contraste con la floración de los controles.

de nuevo para el tercer año en la **Figura 38B**); siendo la línea 20 la que presentó el fenotipo más acentuado.

En años anteriores, se observó un fenotipo floral particular en las líneas con sobre-expresión de *FaSOC1*. Durante los dos primeros años se constató que las plantas *35S:FaSOC1* presentaban flores muy compactas, con sépalos grandes y pétalos pequeños. El segundo año se observó además, que los frutos eran más pequeños que los controles y que en la mayoría de los casos no llegaban a madurar correctamente. Este tercer año persiste el fenotipo floral diferencial de la sobre-expresión de *FaSOC1*. Las plantas presentan flores de grandes sépalos y pétalos pequeños, que les da un aspecto compacto y cerrado (**Figura 39A y H**). Estas flores dan lugar a frutos pequeños, muy duros al tacto y con problemas para madurar completamente (**Figura 39B, C, E y H**). Este año, además se ha observado que los aquenios no llegan a madurar, permaneciendo verdes incluso en los pocos frutos que alcanzan el color rojo intenso de los frutos maduros (**Figura 39D y E**) al contrario que ocurre en los controles (observar comparativa con frutos control **Figura 39F y G**). De nuevo es la línea 20 la que presenta más marcado este fenotipo. En esta línea la maduración nunca es completa, el fruto no alcanza la tonalidad roja, permanece duro y termina resquebrajándose y secándose unido a la inflorescencia (**Figura 39E**). En las otras dos líneas, los efectos son menos espectaculares, algunos frutos (pocos en la línea 9 y algo más de la mitad en la línea 21) consiguen madurar, aunque los aquenios permanecen verdes (**Figura 39D**).

Por tanto, una vez evaluadas las plantas *35S:FaSOC1* durante tres campañas, repitiéndose el fenotipo claramente durante dos años, con un número suficientes de líneas independientes y réplicas biológicas, parece que la sobre-expresión de *FaSOC1* retrasa la floración de 'Camarosa' en SD. A su vez, la sobre-expresión constitutiva de *FaSOC1* favorece el crecimiento vegetativo y promueve el estolonado, a la vez que afecta la morfología floral y la correcta maduración de receptáculo y aquenios. Estos efectos se encuentran más acentuados en la línea 20, existiendo una graduación de los mismos, según el nivel de sobre-expresión de *FaSOC1*.



Figura 39. (A) Detalle de la morfología floral de línea 20. (B, C y E) Detalle de la maduración incompleta del fruto y achenios (círculo azul), de la línea 20. (D) Fruto maduro de la línea 21, con los achenios aun sin madurar completamente (círculo azul). (F) Detalle de fruto y achenio (círculo azul) en fruto verde de 'Camarosa'. (G) Detalle de fruto y achenio (círculo azul) en fruto rojo maduro de 'Camarosa'. (H) Detalle de la morfología floral y la incompleta maduración del fruto en la línea 9, en el fruto más grande se puede observar como comienza a resquebrajarse.

3.3.2 Caracterización de *AGAMOUS LIKE 6 (FaAGL6)* en *Fragaria × ananassa*.

3.3.2.1 Identificación del ortólogo de *AtAGL6* en la fresa cultivada.

En *Arabidopsis* *AtAGL6* actúa como inductor floral al desactivar la expresión de *FLC* y sus homólogos, y activar la expresión de *AtFT* en hoja (Yoo *et al.*, 2011a; Yoo *et al.*, 2011b). Estos estudios indicaron que *AtAGL6* es un importante promotor de la floración. Sin embargo, el gen se identificó originariamente en una búsqueda de líneas de *Arabidopsis* con expresión específica en óvulos (Schauer *et al.*, 2009). Aunque el gen se expresa mayoritariamente en este órgano floral, estudios posteriores confirmaron que *AtAGL6* también se expresa en *Arabidopsis* durante la fase vegetativa de la planta (Yoo *et al.*, 2011a). Como la expresión fue similar en SD y LD, este gen está regulado independientemente del fotoperiodo en esta especie. En *Arabidopsis* *AtAGL6* forma junto con *AtAGL13* una subfamilia de genes MADS tipo MICK^C, con un 67,8 % de similitud entre ellas. Esta subfamilia se encuentra tanto en gimnospermas como en angiospermas y sus funciones no están del todo dilucidadas aunque se conoce que en otras especies también están implicados en la función E del desarrollo floral y en la iniciación floral (Dreni y Zhang, 2016).

Al realizar una búsqueda (mediante BLASTN) sobre el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) y en la base de datos de nucleótidos del NCBI, obtuvimos cuatro secuencias con similitudes a *AtAGL6* y *AtAGL13* (se usaron ambas secuencias en la búsqueda): *gene04563*, *gene24494*, *gene24852* y *gene19428*. Entre estas cuatro secuencias únicamente el *Gene19428-v1.0-hybrid* presentó un porcentaje de similitud importante a *AtAGL6* y *AtAGL13*, siendo un 63% a *AtAGL6* frente al 55% obtenido con *AtAGL13*. Usando como referencia de *gene19428-v1.0-hybrid* se diseñaron los cebadores para el clonaje del ortólogo en *F. × ananassa* cv. Selva (ver Material y Métodos, apartado 2.2.3 **Tabla 5**). Se obtuvo un ORF de 738 bp, que codifica para una proteína de 245 aminoácidos, con un peso teórico de 28,13 KDa y un PI deducido de 9,28. El gen *FaAGL6* presentó un porcentaje de similitud del 99 % con el gen de *F. vesca* (*Gene19428-v1.0-hybrid*; Shulaev *et al.*, 2011). Los porcentajes de identidad con otras especies de la familia de las Rosáceas resultaron elevados: 79, 74 y 73 % con *Prunus pérsica*, *Malus domestica* y *Prunus mume* respectivamente, presentando similares resultados con *Vitis vinifera* (75 %), *Citrus cinensis* (74 %) *Carica papaya* (74 %) y *Arabidopsis* (63 %), lo que sugiere una conservación alta de la secuencia génica de *AGL6* en plantas. Con el fin de investigar las relaciones evolutivas existentes entre *FaAGL6* y otras proteínas homólogas se realizó un árbol filogenético usando las secuencias proteicas de varias especies. En la **Figura 40** podemos observar como *FaAGL6* se agrupó en un clado junto con el gen predicho en el genoma de *F. vesca* (usado para el clonaje) y su homólogo en *Citrus cinensis*, *CcAGL6/MADS11*. También podemos observar como las proteínas homólogas en *Malus doméstica*, *Prunus persica*, *Prunus mume*

y otras especies de plantas perennes se agruparon en el mismo clado, mientras que especies anuales como *Solanum tuberosum*, *Phaseolus vulgaris* o *Medicago truncatula* forman un clado relacionado pero propio. En la **Figura 40**, podemos observar también como los otros genes encontrados en el blastN (sobre el genoma de *F. vesca*) con similitudes a *AtAGL6* y *AtAGL13* (*gene04563*, *gene24494* y *gene24852*) se localizan en clados pertenecientes a otras subfamilias de MICK^C, como son SEPALLATA (SEP) y AGAMOUS (AG).

En el alineamiento múltiple de *FaAGL6* con otras proteínas homólogas observamos un dominio MADS y un dominio Keratin-like conservados. A su vez se observa un dominio Intervening menos conservado y un dominio C-terminal variable entre las diferentes especies. Ohmori *et al.* (2009) describe dos motivos cortos (de diez aminoácidos, cada uno) muy conservados en el dominio C-terminal de monocotiledóneas y *Arabidopsis*. Estos dos motivos son muy parecidos a los descritos por Zahn y colaboradores (2005) en la subfamilia de factores de transcripción SEPALLATA (**Figura 41**). El motivo I (de secuencia DCEPFLQIGY), presente tanto en *AtAGL6* como *AtAGL13*, se encuentra conservado tanto en *FaAGL6* como en *F. vesca* (Fv*gene19428*), con el único cambio de C por P y F por I, como podemos ver en el alineamiento (**Figura 41**). El motivo II (de secuencia ETNFVQGWVL) presente solo en *AtAGL6* (ya que *AtAGL13* no conserva los últimos 4 aminoácidos), también se encuentra conservado en *FaAGL6*. De nuevo nos encontramos únicamente dos sustituciones en la secuencia E por D y la primera V sustituida por I, los últimos cuatro aminoácidos del motivo, que además coinciden con el final de la secuencia, se encuentran conservados, cosa que no ocurre en *AtAGL13* (**Figura 41**). Los resultados obtenidos en la secuenciación, alineamiento y filogenia, nos corroboran que efectivamente hemos conseguido clonar el gen homólogo a *AtAGL6* en el cultivar 'Selva' de fresa.

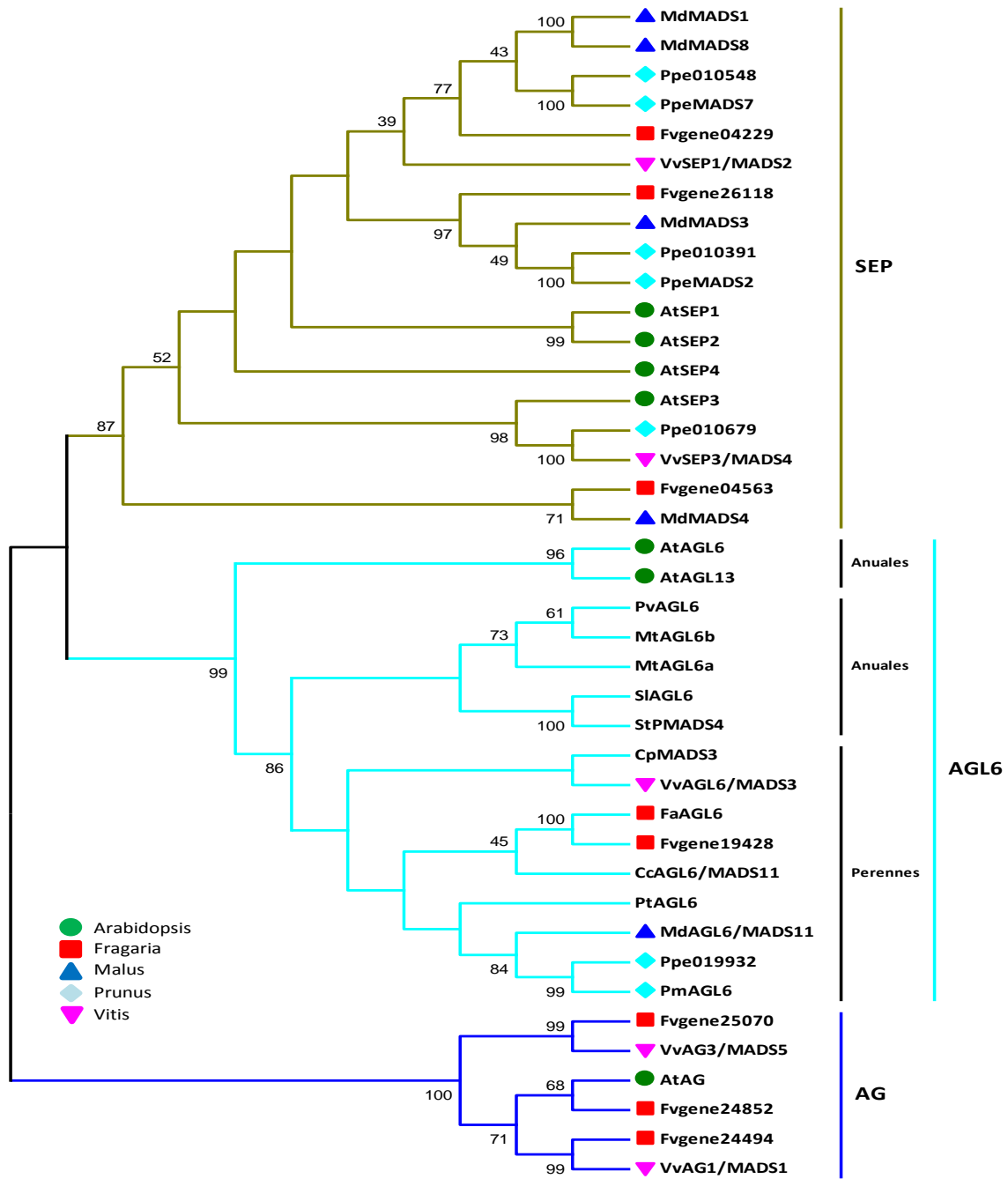


Figura 40. Árbol filogenético de proteínas homólogas de las subfamilias de MADS: SEPALLATA (dorado), AGAMOUS LIKE-6 (celeste) y AGAMOUS (azul). Obtenido mediante el programa Mega 5, 1000 réplicas Bootstrap, método Neighbor-joining. Se muestra solo topología. Números de acceso de las secuencias en apéndice 1 Tabla S3.

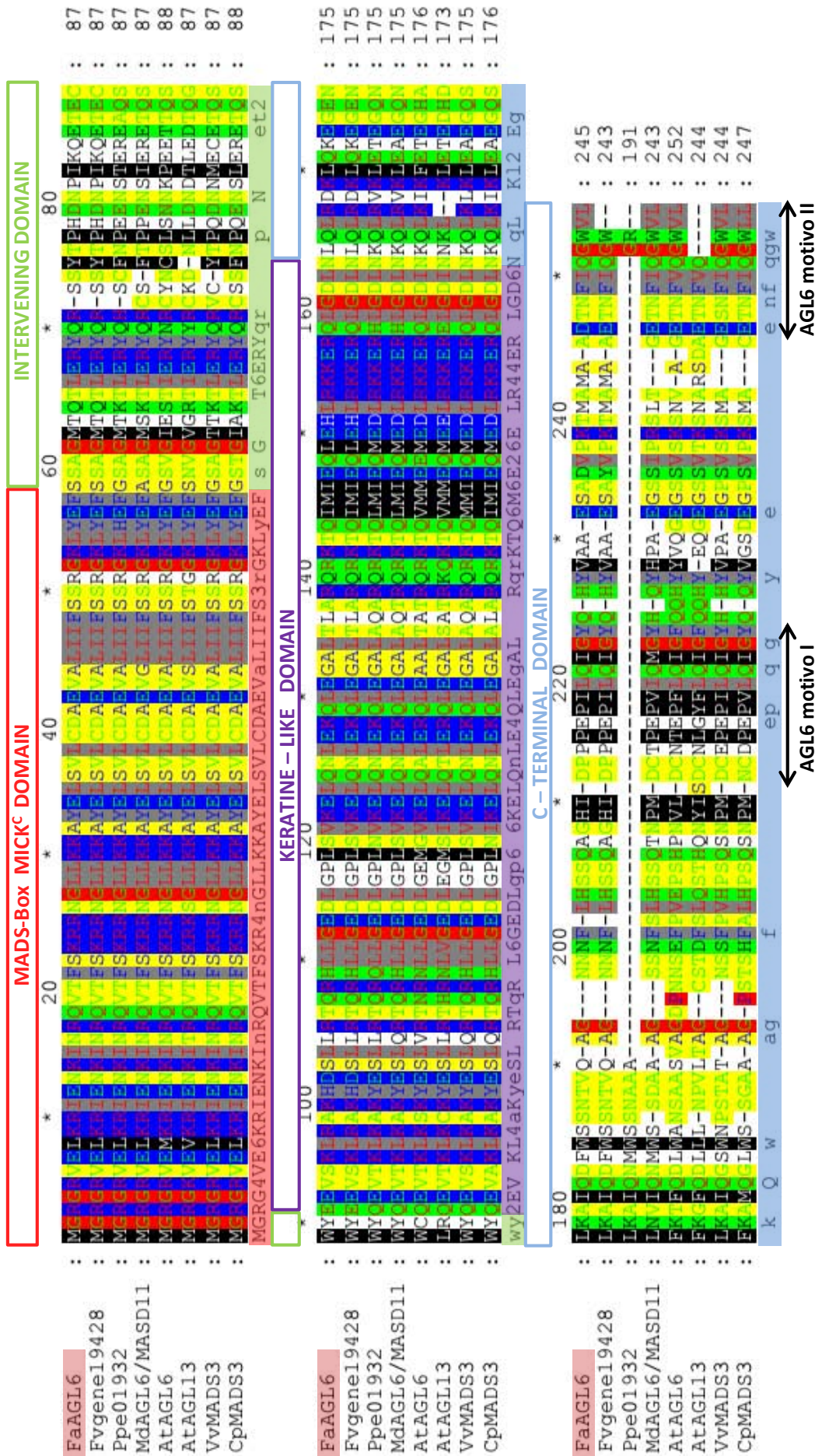


Figura 41. Alineamiento múltiple (ClustalW) de la secuencia de aminoácidos de FaAGL6 junto a proteínas homólogas de otras especies. Sobre el alineamiento se marcan los dominios que caracterizan a la Familia MICK^c: dominio MADS en rojo; Intervening en verde; Keratine-like en morado y C-terminal en celeste. Con flecha negra se marcan los dos motivos propios de AGL6.

3.3.2.2 Análisis de la expresión de *FaAGL6* en distintos órganos.

Para determinar el papel que ejerce *FaAGL6* en fresa, se analizó su expresión relativa en diferentes órganos del cultivar ‘Chandler’. Las muestras de ARN se extrajeron de hojas, raíz y corona, en condiciones de “Día corto” (SD) y en flor cerrada, fruto verde, fruto blanco y fruto rojo, durante la primavera. Los niveles más altos de expresión se encontraron en la flor y en el fruto verde, disminuyendo la expresión drásticamente al avanzar la maduración del fruto. La expresión en corona, fue 6 veces menor a la obtenida en la flor (Figura 42), lo que podría sugerir que al igual que en *Arabidopsis*, *FaAGL6* tiene

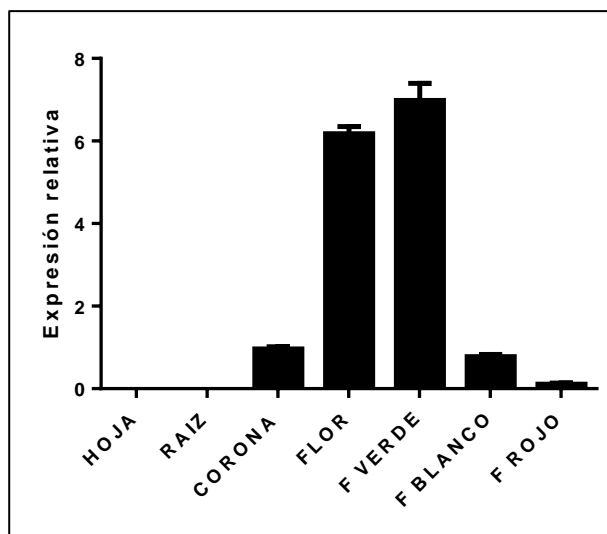


Figura 42. Expresión relativa de *FaAGL6* en distintos órganos de ‘Chandler’. Resultados relativizados a la expresión en corona y normalizados frente a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas biológicas independientes (n = 3).

un papel homeótico sobre el desarrollo del perianto y los óvulos (Schauer *et al.*, 2009). Al igual que *AtAGL6*, también hemos detectado expresión de *FaAGL6* en tejidos vegetativos, que incluyen los meristemos axilares y apical, lo que sugiere que también podría tener un papel en la inducción de la floración en fresa.

3.3.2.3 Diferencias de expresión de *FaAGL6* entre cultivares de fresa que difieren en el tipo de floración.

Con el objetivo de discernir si existen diferencias de expresión de *FaAGL6* entre distintos cultivares de fresa, determinamos los niveles de expresión mediante qRT-PCR en los cuatro cultivares en estudio, ‘Chandler’ y ‘Parker’ con floración estacional de día corto y ‘Selva’ y ‘Fern’ de día neutro. La medición la hicimos tanto en condiciones de día corto como de día largo. Basándonos en los resultados obtenidos en la Figura 42, al no encontrarse expresión en hoja ni raíz, únicamente medimos la expresión relativa en corona.

En la Figura 43 se representan los niveles de expresión relativos de *FaAGL6* obtenidos en SD (representado en negro) y en LD (en gris). Los cuatro cultivares evaluados siguieron un patrón de expresión muy similar, con al menos 5 veces mayor expresión en SD que en LD. Estas diferencias fueron más acusadas en el caso de los cultivares ‘Chandler’ y

'Selva' (Figura 43A y D) ya que no se detectó ninguna expresión mediante qRT-PCR en condiciones de LD.

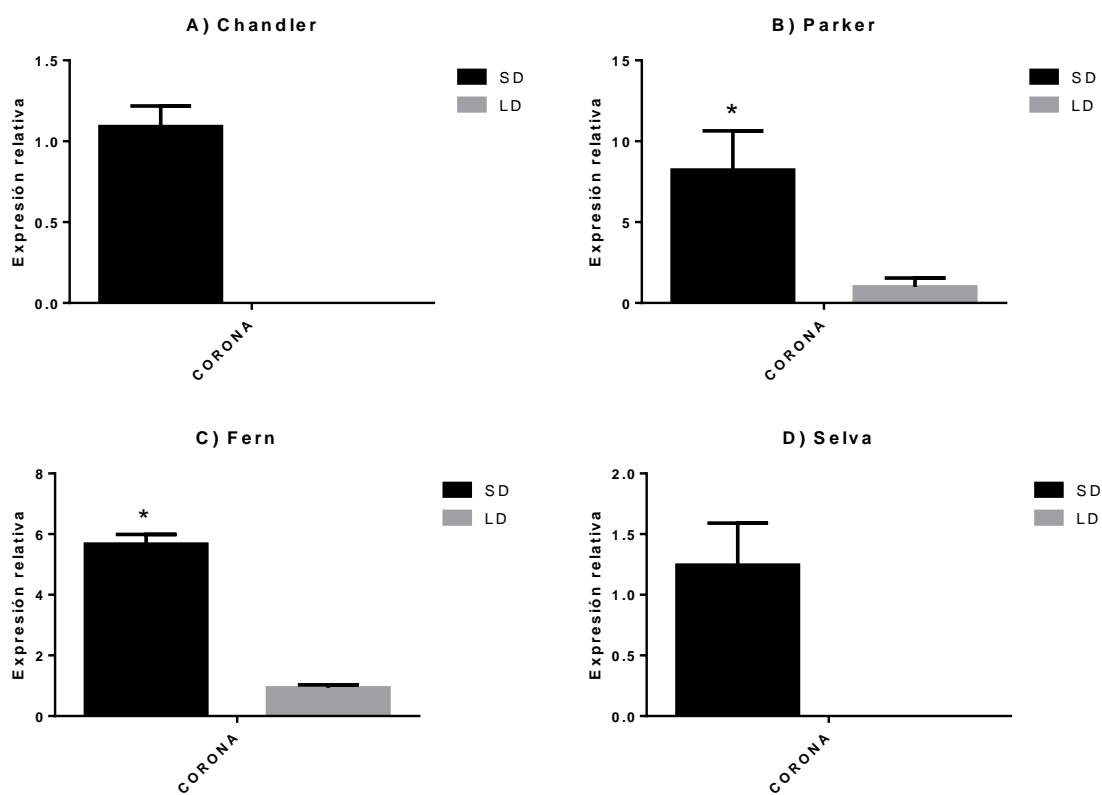


Figura 43. Expresión relativa de *FaAGL6* bajo condiciones de fotoperiodo de SD (barra en negro) y LD (barra en gris), para cuatro cultivares distintos: dos de día corto (A) 'Chandler' y (B) 'Parker'; y dos de día neutro: (C) 'Fern' y (D) 'Selva'. Expresión relativizada a CORONA-LD en todos los casos y datos normalizados a la expresión de *FaGADPH*. La barra de error representa la desviación estándar de tres réplicas biológicas ($n = 3$). Los asteriscos representan diferencias significativas entre SD y LD; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. *T-test* de Welch.

3.3.2.4 Análisis de la sobre-expresión de *FaAGL6* en 'Camarosa'.

Para tratar de profundizar en la función de *FaAGL6* e investigar si su expresión constitutiva es capaz de afectar la floración de la fresa, se generaron plantas transgénicas de fresa (*F. × ananassa* cv. Camarosa) que sobre-expresan este gen bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S*. Tras la transformación de unos 200 discos de hoja y varios subcultivos en presencia del antibiótico selectivo, se obtuvo un elevado número de líneas transformantes independientes. La presencia del transgen se confirmó mediante PCR sobre ADN genómico. De entre los transformantes confirmados, se escogieron nueve líneas y se las sometió a un periodo de aclimatación antes de pasarlas a macetas en invernadero.

Una vez establecidas las líneas en el invernadero, se procedió a la evaluación de los niveles de expresión de *FaAGL6* que presentaba cada línea. El muestreo se realizó sobre hoja tomada a las 12:00 de la mañana. En la **Figura 44A** se representan los niveles de sobre-expresión, obtenidos mediante qRT-PCR, de las nueve líneas aclimatadas relativizadas a la expresión obtenida en la línea *35S:FaAGL6* con menor expresión (línea 2), ya que *FaAGL6* no se expresa en la hoja por lo que la expresión en las líneas control (Pgus2 y Pgus3) fue inexistente. Las líneas 3, 5, 7, 9 y 10 presentaron una sobre-expresión elevada mientras que las líneas 1, 8 y 11 mostraron unos niveles de sobre-expresión más parecidos a la línea 2.

Al tratarse de líneas que provienen de un largo proceso de transformación y multiplicación *in vitro* se procedió a evaluar los mismos caracteres y de igual forma que para la sobre-expresión del gen *FaCO* (apartado 3.1.5.1).

3.3.2.4.1 Evaluación en el Primer año (2014)

Durante el primer año de evaluación de las líneas *35S:FaAGL6* no se observaron diferencias significativas fenotípicas respecto de las líneas control (**Figura 45**). Todas las líneas presentaron un crecimiento normal y consiguieron estolonar de una manera eficiente, excepto la línea 8, que enfermó por araña blanca durante toda la campaña, lo que la invalidó para un segundo año de estudio. Como podemos observar en la **Figura 44B**, menos la línea 8 (que hemos excluido del análisis por su infección con araña blanca) y la línea 7, las demás líneas florecieron antes que los controles, una media de 17 días antes.

Respecto al número total de flores producidas por las líneas transgénicas nos encontramos que la mayoría de líneas produjeron mayor número de flores que las líneas control **Figura 44C**. Concretamente seis de las nueve líneas contabilizaron mayor o igual número de flores que el control Pgus3 (línea 1, 3, 5, 7, 10 y 11). Únicamente la línea 2 produjo un número de flores inferior a la media de los controles. Existiendo dos líneas (8 y 9) con una producción de flores intermedia, muy cercana a la media de los controles.

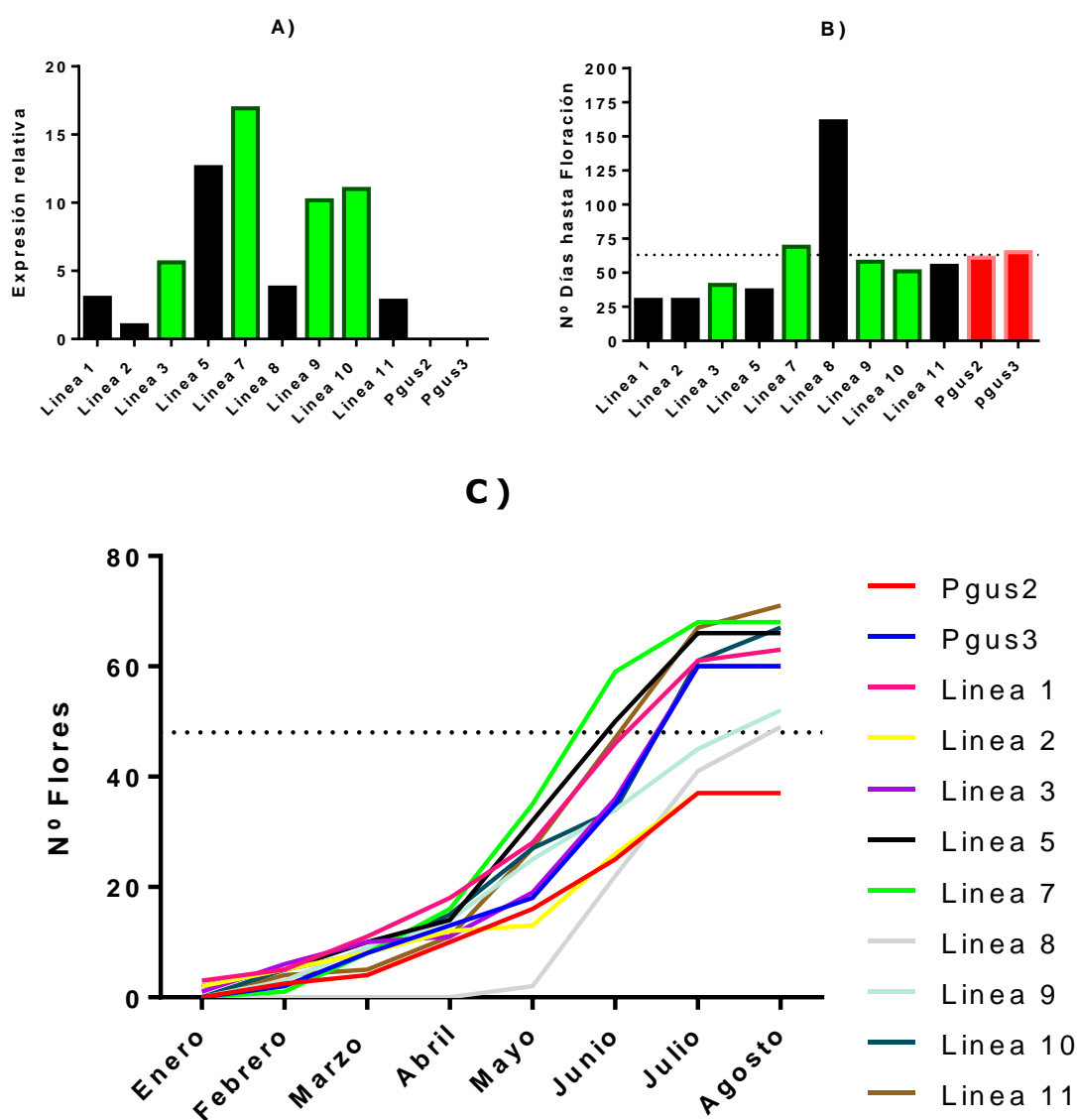


Figura 44. (A) Niveles de expresión de *FaAGL6* en las líneas transgénicas *35S:FaAGL6* (barras en verde y negro) relativizados a la expresión de la línea 2 (*FaAGL6* no se expresa en hoja) medidos por qRT-PCR. (B) Días hasta la aparición de la primera flor en cada línea transgénica y en los controles, medidos desde la finalización de la aclimatación. La línea horizontal discontinua representa la media de días hasta el inicio de la floración de las líneas control (63 días). (C) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de Enero hasta el 31 de Agosto. Línea discontinua representa el número medio de flores producidas por los controles (48 flores).

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos durante el periodo de floración, los niveles de sobre-expresión y la capacidad para estolonar, se decidió multiplicar vegetativamente las líneas 3, 7, 9 y 10 (marcadas en verde en la Figura 44A y B) para proceder a un segundo año de evaluación fenotípica.

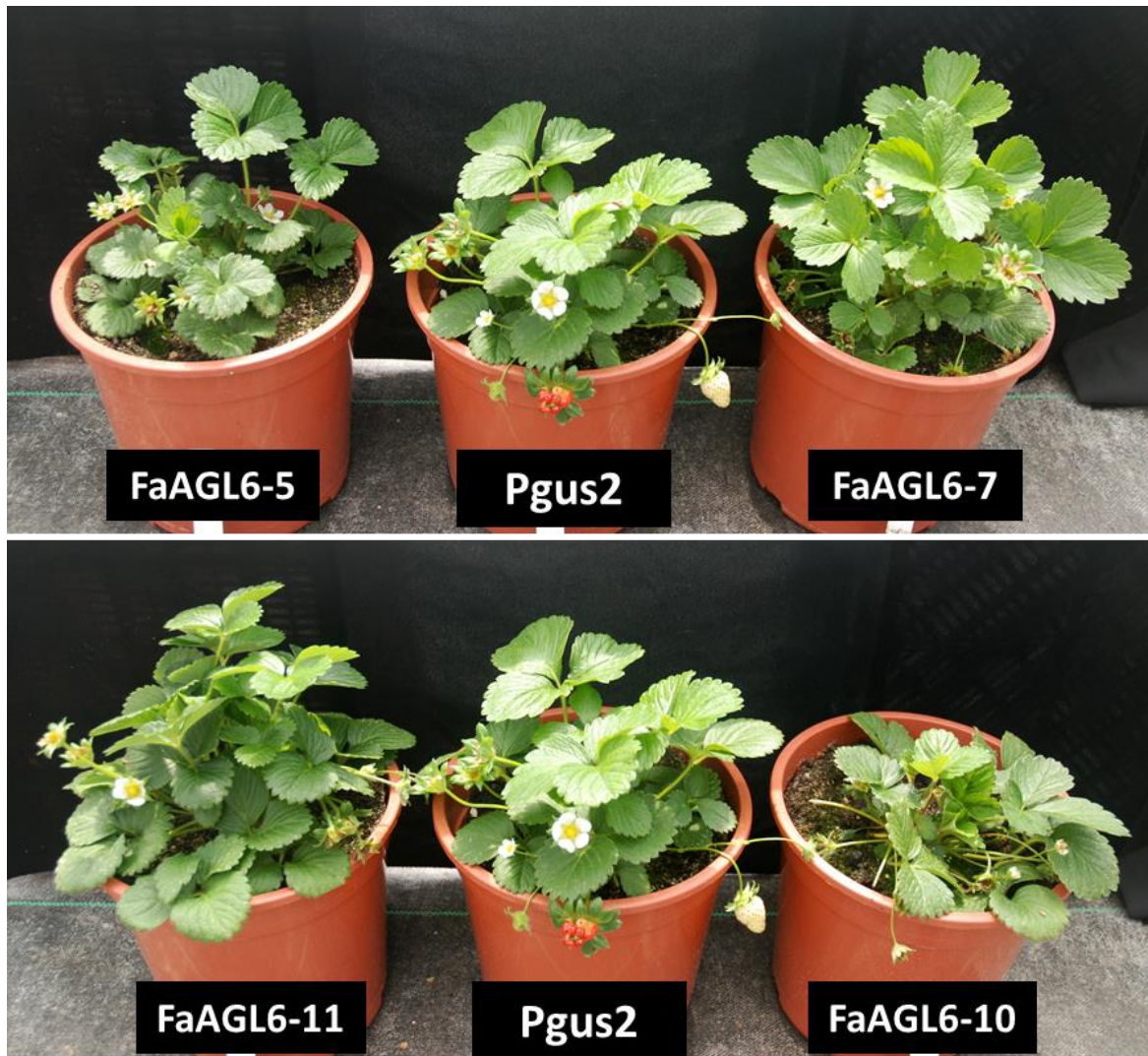


Figura 45. Fotos de líneas transgénicas *35S:FaAGL6* representativas y el control de transformación *Pgus2* (tomado como referencia de las líneas control *35S:GUS*).

3.3.2.4.2 Evaluación en el Segundo año (2015).

En el segundo año de análisis se usaron cuatro líneas *35S:FaAGL6*: línea 3, línea 7, línea 9, y línea 10 (ver apartado anterior). De cada línea se evaluaron 9 plantas (réplicas biológicas) obtenidas por multiplicación vegetativa a partir de estolones. Como controles se usaron 16 plantas; 5 del control de *Pgus3* y 11 plantas de la línea control *Pgus2* (ambos controles de transformación *35S:GUS*). Además se usaron 9 réplicas de ‘Camarosa’ (nombradas ‘Camarosa’ Wild type) que no han sufrido el proceso de transformación.

Durante la multiplicación vegetativa de las líneas, en los meses de septiembre y octubre, se produjo en el invernadero un brote importante de araña blanca (*Steneotarsonemus pallidus* Banks.) que afectó por igual a las madres y a los estolones de las líneas transgénicas de *35S:FaAGL6* en evaluación. Como consecuencia de ello, la mayoría de las plantas de esta segunda campaña mostraban síntomas de la plaga. Al principio, meses de diciembre y enero, los síntomas eran evidentes, existiendo réplicas muy

afectadas. Conforme fue avanzando el estudio, gracias a los sucesivos tratamientos, las plantas fueron mejorando paulatinamente, pero aun así varias réplicas murieron o no pudieron ser evaluadas correctamente. Concretamente en el caso de *35S:FaAGL6* la línea 10 fue la más afectada, fuimos incapaces de multiplicarla en número necesario para su correcta evaluación, por lo que no será tomada en cuenta en el análisis de los resultados.

El seguimiento de las líneas comenzó en diciembre de 2014 y se extendió hasta inicios de septiembre del año 2015. A lo largo de esta campaña se tomaron datos de inicio de floración, se contó el número total de flores producidas por cada planta, para determinar si existía una mayor inducción de meristemos florales. Además se evaluaron otros efectos fenotípicos que pudieran afectar al desarrollo de la planta como su vigor y tamaño *de visu*, así como el inicio del estolonado. En la **Figura 46A** se representan los resultados del inicio de la floración. Únicamente la línea 3 adelantó su floración en 27 días, las otras dos líneas florecieron al mismo tiempo que los controles. Al igual que en el caso de la transformaciones *35S:FaCO* y *35S:FaFD2* no existieron diferencias significativas en el número de flores producidas (**Figura 46B**). Sin embargo, la línea 7 presentó un adelanto (20 días) en la producción de estolones (**Figura 46C**) aunque no mostró diferencias significativas con los controles en el número de estolones producidos durante la campaña (**Figura 46D**).

En la temporada anterior tres de las cuatro líneas *35S:FaAGL6* evaluadas presentaron un adelanto en su floración (**Figura 44B**), siendo la línea 7 la única que no vio adelantada su floración con respecto a los controles. Al igual que este año, la línea 3 fue la más precoz en su floración.

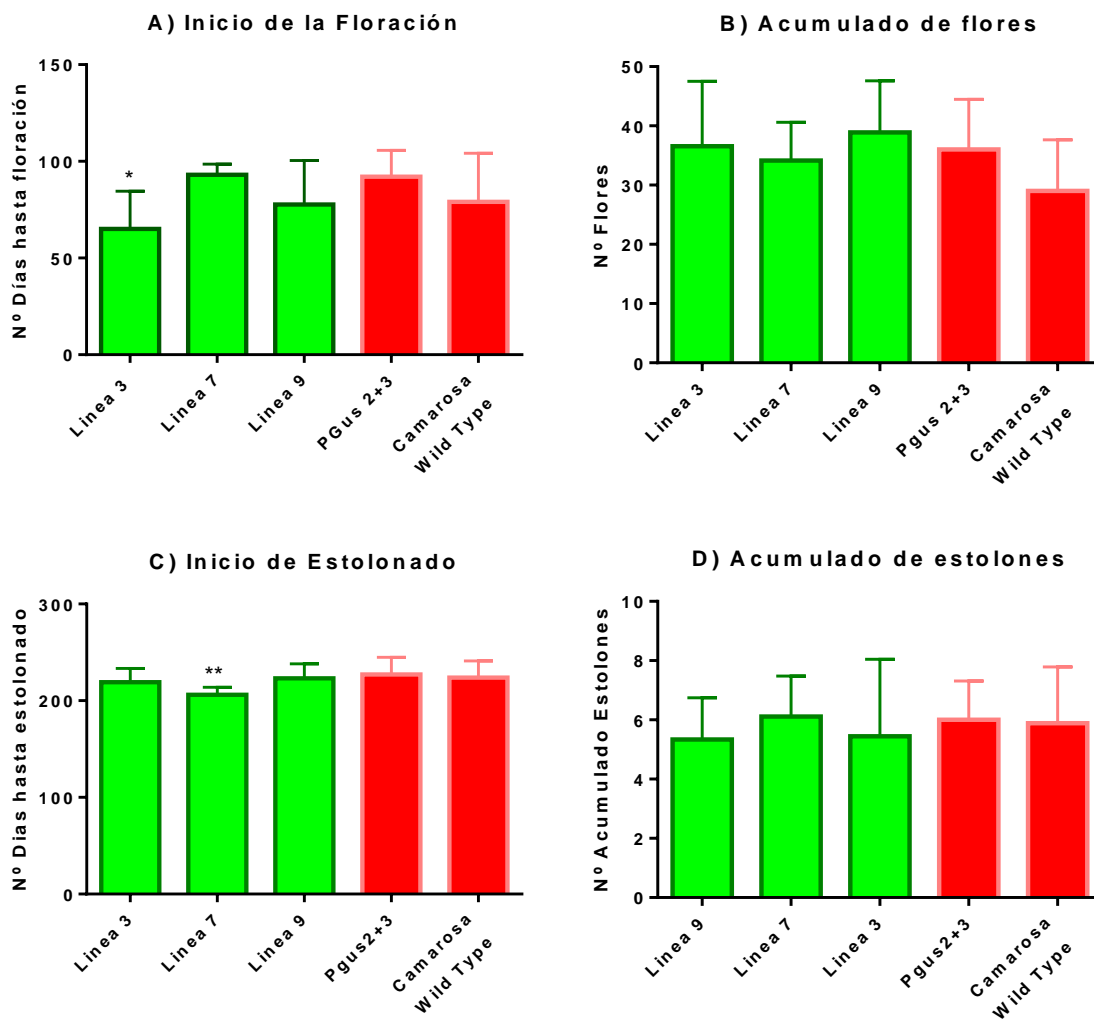


Figura 46. (A) Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas *35S:FaAGL6* (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). (B) Número de flores producidas por cada línea desde el 1 de diciembre hasta el 3 septiembre. (C) Número de días transcurridos hasta la aparición del primer estolón. (D) Número de estolones producidos por cada línea durante el estolonado. Los asteriscos representan diferencias significativas entre Pgus2+3 y líneas transgénicas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.**

3.3.2.4.3 Evaluación en el Tercer año (2016).

Durante el verano las líneas transgénicas fueron de nuevo multiplicadas mediante estolones para su evaluación durante un tercer año. De la línea 7 se han evaluado ocho plantas, mientras que de las líneas 3 y 9 se han evaluado diez plantas. Del control de transformación P_{gus2+3} se han evaluado 20 réplicas y del control de 'Camarosa' otras 22 plantas. Al igual que en el año anterior, la evaluación de las líneas comenzó en Diciembre.

En la **Figura 47** se observa como las tres líneas evaluadas florecieron al mismo tiempo que los controles. El año anterior la línea 3 mostró un adelanto en la floración, y aunque este año también floreció antes que las otras líneas, no lo suficiente para adelantarse significativamente a los controles.

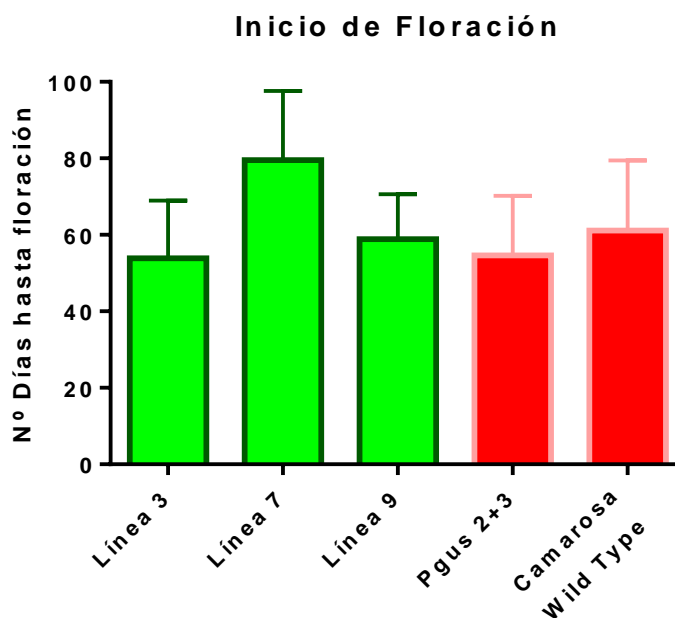


Figura 47. Días transcurridos hasta el Inicio de la floración en las líneas **35S:FaAGL6** (columnas en verde) comparado con las líneas control (en rojo). Los asteriscos representan diferencias significativas entre P_{gus2+3} y líneas transgénicas; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. ANOVA Post-Hoc de Dunnett.

4. Discusión.

La fresa (*F. × ananassa*), es uno de los cultivos frutícolas con mayor importancia económica en el mundo. España se encuentra situado en el quinto puesto mundial en producción de fresas y es el primer exportador mundial, suministrando a los mercados europeos más de 260000 toneladas de fresa al año, con unos beneficios económicos superiores a los 50 millones de euros (FAOSTAT, 2013; **Tabla 1, 2 y 3**). Aproximadamente el 90% de la producción fresera española se concentra en la provincia de Huelva (Andalucía), convirtiéndose en uno de los principales motores económicos de la provincia y en el sustento de muchas familias (Núñez, 2008). Lo que hace a la provincia de Huelva tan competitiva es su temprana entrada en producción. Esto permite a las cooperativas y productores andaluces copar los mercados centroeuropeos antes que los productores locales, proporcionando fresas en fechas nada habituales para estos países. Esto hace que los precios y la rentabilidad del producto aumenten considerablemente. Por esta razón, el adelanto de la producción, así como la posibilidad de extenderla a verano y otoño, para abrir mercados nuevos, sea uno de los objetivos principales, tanto de los productores como de la industria en general. Tradicionalmente en Huelva, la precocidad se conseguía gracias a cultivares de SD y a la utilización de una industria auxiliar, los viveros de altura, que permitían asegurar la entrada en producción en la segunda quincena de Diciembre, gracias a la superación de los requisitos de frío (vernalización) y la sincronización de las plantas, al crecerlas en la meseta norte del país (López-Aranda, 2008). Pero con estas prácticas agronómicas se ha tocado techo y los mejoradores son incapaces de adelantar más la producción, a la vez que el uso de cultivares de SD impide extender la producción más allá de Junio. Por ello, en la actualidad existe un especial interés en la mejora y utilización de variedades de fresa de floración perpetua (EB o PF) por parte de los mejoradores y las empresas del sector. Con ello se conseguiría extender el periodo productivo a la vez que trasladar parte de la producción a fechas donde tradicionalmente la producción fresera era muy baja o inexistente, con el posible valor añadido para el producto. Un ejemplo de esto son los programas de mejora e introducción en el mercado de nuevas variedades de DN llevados a cabo por compañías españolas como Fresas Nuevos Materiales S.A. (FNM; <http://www.fresasnm.com>) o Planasa (<http://www.planasa.com>).

Además de la importancia económica, la fresa cultivada, es un cultivo muy apreciado tanto por su sabor como por su contenido nutricional (Fait *et al.*, 2008) así como por los efectos saludables derivados de su consumo (Seeram, 2008). Por todas estas razones, es muy importante comprender los mecanismos que controlan la floración (y en definitiva la fructificación) del cultivo, para optimizar la producción y focalizar el esfuerzo dedicado a la mejora genética del cultivo (Stewart y Folta, 2010). Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la floración en fresa están muy poco estudiados.

4.1 *FaCO* es el gen ortólogo a *CO* en *Fragaria* × *ananassa*.

Los genes *COL* conforman una familia de TF presentes en plantas. El primer *COL* descrito se identificó en *Arabidopsis* (Putterill *et al.*, 1995). La característica que define a esta familia es la presencia en el extremo amino terminal de dos motivos B-box en tándem, con sus respectivos dedos de zinc, formados por cuatro residuos de cisteína con una estructura muy conservada (C-X2-C-X16-C-X2-C) en cada uno. En el extremo carboxilo terminal nos encontramos con el dominio CCT, con una longitud aproximada de 45 aminoácidos, muy conservado en angiospermas. Además de estos dominios, las proteínas de esta familia poseen cuatro regiones (en la parte intermedia de la secuencia; M1 a M4) parcialmente conservadas y justo en el extremo amino terminal un motivo muy conservado, de estructura: G-I/V-V-P-S/T-F (Griffiths *et al.*, 2003). Todos estos dominios y motivos, junto con sus aminoácidos clave, que definen a la familia y que son responsables de la funcionalidad de la misma, se encuentran íntegramente conservados en *FaCO* (Figura 7). Igualmente, los aa descritos como importantes para la función de *AtCO* basados en el estudio de mutantes de floración tardía en *Arabidopsis* también se encuentran conservados en *FaCO*. En *Arabidopsis* la familia *COL* está formada por 17 miembros, divididos en tres grupos diferentes, según la conformación de los dos dominios B-Box. El grupo I posee 2 B-Box, el grupo II tiene un único B-Box y el grupo III, tiene dos B-Box pero el segundo de ellos modificado (Griffiths *et al.*, 2003). En la búsqueda realizada sobre el genoma de *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) se encontraron al menos seis representantes putativos (*CO-like*), con al menos un representante en cada uno de los grupos que conforman la familia *COL* (Figura 8). De manera similar, en *Boehmeria nivea* (Liu *et al.*, 20015), *Chrysanthemum* (Fu *et al.*, 2014) o *vitis* (Almada *et al.*, 2009), se han identificado al menos 6, 11 y 14 *CO-like* (respectivamente), con representantes distribuidos en los tres grupos descritos. Concretamente, *FaCO* se localizó en el grupo I, junto con *AtCO* y otras secuencias descritas en la bibliografía como ortólogas a esta (*VvCO*, *StCOL*, *PdCO1,2* y *OsHd1*) (Figura 8 y 9). El conjunto de evidencias obtenidas indican que la familia de factores de transcripción *COL* está presente en *Fragaria* y que el gen *FaCO*, al ser el más conservado y poseer todos los dominios y motivos claves, sería el ortólogo a *AtCO* en *F. × ananassa*.

4.2 Implicaciones del patrón de expresión observado para *FaCO*.

FaCO se expresa mayoritariamente en hoja, al igual que ocurre en numerosas especies estudiadas como *Arabidopsis* (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004), *Populus deltoides* (Yuceer *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2012) y *Chrysanthemum* (Fu *et al.*, 2014) con bajos niveles de expresión observados en raíz y corona, en lo que respecta a órganos vegetativos. La expresión de *FaCO* también fue importante en la flor (sin ser superior a la de hoja) y fruto verde, disminuyendo paulatinamente a lo largo de la maduración del fruto

(Figura 10). El patrón de expresión de *FaCO* es muy similar al observado en *Vitis vinifera* (*VvCO*, Almada *et al.*, 2009), tanto en los órganos vegetativos como en la flor y el fruto. La mayor expresión de *CO* en la hoja es consistente con su función conocida, ya que es en el núcleo de las células que circundan los haces vasculares de la misma donde actúa este factor de transcripción, activando la expresión de *FLOWERING LOCUS T* en *Arabidopsis* (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004) y arroz (Hayama *et al.*, 2003).

Recientemente, en *Prunus persica* se identificó *PpeCO*, aunque este gen no es el más próximo filogenéticamente hablando a *FaCO* (**Figura 8**), presentó un patrón de expresión similar a *FaCO* (Zhang *et al.*, 2015). Mediante ensayos de expresión transitoria en levaduras, estos autores demostraron que *PpeCO* es capaz de activar la actividad transcripcional, por lo que posiblemente actúe como factor de transcripción en melocotón, al igual que ocurre en *Arabidopsis* (Valverde *et al.*, 2004; Suarez-López *et al.*, 2001) y arroz (Hayama *et al.*, 2003; Hayama y Coupland, 2004). La sobre-expresión ectópica de *PpeCO* (Zhang *et al.*, 2015) y un ortólogo a *CO* de *Populus spp.* (*CO1*, Hsu *et al.*, 2012) en *Arabidopsis* es capaz de revertir el retraso en la floración de los mutantes de *AtCO*. Lo que implica que los genes ortólogos a *CO* en melocotón y chopo pueden funcionar como reguladores positivos de la floración. Dada la cercanía evolutiva entre *Prunus* y *Fragaria* (ambas son rosáceas) es probable que *FaCO*, también sea capaz de revertir el fenotipo de los mutantes de *Arabidopsis*, aunque el experimento debería llevarse a cabo en el futuro.

Por otra parte en *F. vesca* y *Rosa* existen cultivares con floración estacional y floración perpetua. En estas especies la floración estacional (y por tanto la represión de la floración en LD) se debe a la acción de un único gen dominante, llamado *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)* y *RECURRENT BLOOMING (RB)*, respectivamente. Accesiones de fresas del bosque o rosa con alelos recesivos en este *locus* florecen de manera continua, es decir, independientemente del fotoperiodo (Brown y Wareing, 1965; Semeniuk, 1975). Iwata *et al.* (2012) mostraron que los *loci SFL* y *RB* codifican para el homólogo a *TFL1*; y que mutaciones recesivas producidas en sus respectivos genes (*FvTFL1* y *KSN*) producen floración perpetua en ambas especies. La caracterización funcional de *FvTFL1* confirmó su papel como un fuerte represor floral, causante de la floración estacional en *F. vesca* (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012). *FvTFL1* presenta altos niveles de expresión durante el crecimiento vegetativo (LD) principalmente en el SAM, pero también en hoja y tejido vascular, y por el contrario muy bajos en SD (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012; Mouhu *et al.*, 2013). Koskela *et al.* (2012) proponen que la inducción de la floración en *F. vesca* solo ocurre cuando los niveles de *FvTFL1* son bajos por la acción del SD, mientras que la elevada expresión de *FvTFL1* al final de la primavera, inhibe la floración favoreciendo el crecimiento vegetativo de la planta en el verano, asegurando la multiplicación vegetativa mediante estolones y un nuevo ciclo al año siguiente. Recientemente, Rantanen *et al.* (2015) han

puesto de manifiesto como la expresión de *FvFT1* (un ortólogo a *AtCO*) solo se produce (en hoja) en condiciones de LD, por lo que se correlaciona negativamente con la floración, al contrario de lo que ocurre en *Arabidopsis* (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004). Por tanto, en *F. vesca* *FvFT1* activa la expresión en el SAM del ortólogo de *SOC1* (*FvSOC1*) específicamente bajo LD (Mouhu *et al.*, 2013; Rantanen *et al.*, 2014) y es el TF MADS *FvSOC1* el que activa la expresión del represor de la floración *FvTFL1* (Koskela *et al.*, 2012; Mouhu *et al.*, 2013). Similares perfiles de expresión de *TFL1* han sido detectados en *Malus domestica*, con elevados niveles de expresión durante el crecimiento vegetativo y bajos niveles durante el verano, cuando tiene lugar la floración (Hättash *et al.*, 2008; Mimida *et al.*, 2011). Esto unido a que el silenciamiento del homólogo a *TFL1* en manzana y peral (Freiman *et al.*, 2012) producen floración perpetua, inclinan a pensar que *TFL1* es un represor muy fuerte y clave en la floración estacional de las *Rosaceas* (Kurokura *et al.*, 2013).

Iwata *et al.* (2012) y Nakano *et al.* (2015) defienden que en la fresa silvestre y la cultivada (respectivamente) existen al menos tres genes con homología a *AtFT*, nombrados como: *Fv/FaFT1*, *Fv/FaFT2* y *Fv/FaFT3*. El primero de ellos (*Fv/FaFT1*) actúa como un represor de la floración en *F. vesca* (Iwata *et al.*, 2002; Koskela *et al.*, 2012; Mouhu *et al.*, 2013; Rantanen *et al.*, 2015) y *F. × ananassa* (Koskela *et al.*, 2016) al activar vía *Fv/FaSOC1* la expresión de *Fv/FaTFL1*. En la fresa cultivada la expresión de *FaFT1* queda relegada a LD y se correlaciona positivamente con la de *FaSOC1* y *FaTFL1* (Koskela *et al.*, 2016). Por tanto, la actividad de *FT1* y *SOC1*, fundamentales en la inducción de la floración en *Arabidopsis*, muestran un comportamiento totalmente contrarios en el género *Fragaria*. La expresión de *FaFT3*, por el contrario, se ha localizado en el meristemo de plantas crecidas bajo condiciones inductoras de floración (SD), y se correlaciona positivamente con una elevada expresión en el meristemo de *FaAP1*, lo que indica que la inducción floral a tenido lugar (Nakano *et al.*, 2015). Por otra parte, *FaFT2* se expresa 100 veces más en botones florales que en la hoja o el meristemo (Koskela *et al.*, 2012), esto unido a que su expresión fue detectada en plantas que estaban diferenciando estambres y con unos elevados niveles de *FaAP1* (Nakano *et al.*, 2015), inclinan a pensar que este gen actúa después de que la inducción floral ocurra. Nuestros resultados confirman que *FaCO* ve alterada su expresión a lo largo del día, en ambos fotoperiodos analizados (**Figura 11**). Este patrón ha sido observado en soja (Wu *et al.*, 2014), uva (Almada *et al.*, 2009) y patata (González-Schain *et al.*, 2012; Abelenda *et al.*, 2016). En *F. vesca* también se observa el mismo patrón de expresión, con un pico de expresión fuerte de *FvCO* (*gene04172-v1.0-hybrid*) justo al amanecer y un valle de expresión en las horas centrales del día, la recuperación de la expresión durante la noche no fue muestreada, aunque puede intuirse dada la elevada expresión de la mañana (Rantanen *et al.*, 2014). La oscilación diurna exhibida por *FaCO*, *FvCO*, *GmCOL1a* y *b*, *VvCO* y *StCOL1* es sorprendentemente diferente a la mostrada por

AtCO, ya que este presenta un pico de expresión al final del periodo de luz durante la tarde (solo en LD), que genera una acumulación de proteína CO, que termina activando a *FT* y desencadenando la floración (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004). Pero tanto en fresa, soja, uva y patata, los picos de expresión de *CO* se producen al amanecer, no en la tarde, por lo que la acumulación de CO debe producirse de forma distinta a *Arabidopsis*, por la mañana. En arroz, otra planta con floración de SD, se ha comprobado que la ruta metabólica para la activación y regulación de la floración por el fotoperiodo, está ampliamente conservada, pero *OsHd1* (ortólogo a *AtCO*) tiene un comportamiento dual y contrario al mostrado en *Arabidopsis*, inhibe la expresión de *OsHd3a* (ortólogo a *AtFT*) en LD y la activa en SD (Yano *et al.*, 2000; Izawa *et al.*, 2002). Cómo *OsHd1* es capaz de realizar la acción contraria en LD y cómo pueden estabilizarse los niveles de proteína en oscuridad para poder actuar en arroz, necesita de estudios más exhaustivos, aunque parece que estar relacionado con la actividad de algún fitocromo (Hayama *et al.*, 2003; Hayama y Coupland, 2004; Nemoto *et al.*, 2016). Recientemente Abelenda *et al.* (2016) han sugerido que, en patata, la actividad de *phyB* (fitocromo B) es capaz de estabilizar los niveles de *StCOL1* justo al amanecer bajo condiciones de LD, actuando como un represor de la tuberización. En la soja (especie que florece en SD) la elevada expresión de *GmCOL1a* y *GmCOL1b* justo al amanecer coincide con una elevación de la expresión de *GmFT5a* (homólogo a *AtFT*) a la vez que la expresión ectópica de estos dos genes *CO*-like restablece la floración del mutante *co-1* de *Arabidopsis*.

Nosotros hemos comprobado como la expresión de *FaCO* se ve afectada por el ritmo circadiano, encontrando que la mayor expresión se localiza justo en el amanecer, y no en la tarde como ocurre en *Arabidopsis* (Suarez-López *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004). En soja y patata, los respectivos homólogos a CO consiguen estabilizar sus niveles de proteína al amanecer (Wu *et al.*, 2014; Abelenda *et al.*, 2016). Es de suponer que *FaCO* puede actuar de la misma forma, estabilizándose durante la mañana y actuar, induciendo floración bajo condiciones de SD. Si esta fuera su función, *FaFT3* sería el gen diana más probable, sobre el que *FaCO* ejercería su función promotora, ya que es el único de los tres que parece estar correlacionado positivamente con la floración (Nakano *et al.*, 2015). Sin embargo, la baja expresión en hoja de *FaFT3* haría necesaria la intervención de otro gen que traslade la información desde la hoja al meristemo, ya que la expresión de *FaCO* observada en la corona fue baja (**Figura 10**). Aun así, sería muy interesante realizar un (i) estudio más exhaustivo sobre los niveles de expresión antes y después del amanecer (tanto en SD como LD) para monitorizar con mayor exactitud el pico de expresión de *FaCO*. (ii) La realización de experimentos complementarios para comprobar la estabilización de *FaCO* durante la mañana y analizar una correspondiente inducción de *FaFT3* en el meristemo. (iii) caracterizar de manera similar los otros dos genes de fresa identificados en el grupo I

de la familia COL (**Figura 8**). Estos experimentos serian de gran ayuda a la hora de comprobar el papel que ejerce el gen *CONSTANS* en *Fragaria*.

4.3 La sobre-expresión de *FaCO* afectó negativamente al tamaño de la planta y a la capacidad de reproducción asexual de *Fragaria* × *ananassa*.

La sobre-expresión de *FaCO* en *F. × ananassa* al principio afectó al crecimiento vegetativo de las plantas transgénicas, que vieron sensiblemente reducido su tamaño durante todo su primer año de vida (**Figura 14**). Con la llegada de verano (LD) cuando las plantas dejaron de florecer y retomaron el crecimiento vegetativo, este continuó afectado: las plantas siguieron mostrando un tamaño reducido, produjeron pocas hojas nuevas y la mayoría de las líneas estolonaron mal, incluso tres líneas no estolonaron (**Figura 13**). Hsu *et al.* (2012) han descrito un comportamiento similar en chopo. La sobre-expresión de *CO1* y *CO2* en *Populus spp.* resultó en arboles significativamente más pequeños y con un diámetro de tronco menor a los controles. En los siguientes años de evaluación, no se observó efecto sobre el tamaño de las líneas ni en su capacidad para estolonar (a excepción de la línea 12, que produjo un número de estolones menor). Esto fue debido en parte a la incapacidad de algunas líneas para multiplicarse vegetativamente el primer año, lo que nos impidió continuar con su evaluación en años posteriores. Puede que por este motivo se perdieran líneas que desde el punto de vista de experimento fueran más interesantes, ya que podrían estar manifestando alguna alteración del metabolismo producida por la sobre-expresión del transgen. Este efecto negativo sobre el estolonado no se observó en ninguna de las tres campañas sobre los controles ni sobre ninguna de las líneas transgénicas que sobre-expresaban los otros genes, sugiriendo que fue un efecto específico causado por la expresión constitutiva/ectópica de *FaCO*. Por lo tanto, podemos concluir que la sobre-expresión de *FaCO* afectó negativamente a la producción de estolones en fresa.

El estolonado es un proceso similar a la tuberización en patata son una forma de reproducción vegetativa (González-Schain *et al.*, 2012; Abelenda *et al.*, 2016). *StCOL1* reprime la tuberización en LD y la sobre-expresión de *StCOL1* reprime la tuberización bajo condiciones inductoras de la misma (SD) (Abelenda *et al.*, 2016). Puede ser que de alguna forma, la sobre-expresión de *FaCO* afecte negativamente al estolonado directa o indirectamente, a través de la reducción del crecimiento vegetativo. De ser así, la sobre-expresión de *FaCO* podría estar reprimiendo a *FaFT1* en hoja y con ello afectar negativamente el estolonado, al verse deprimida la expresión de *FaSOC1* vía *FaFT1*, como explicaremos más adelante al hablar del efecto de *FaSOC1* sobre el estolonado y la floración (Mouhu *et al.*, 2013; Rantanen *et al.*, 2014).

Aunque al principio, las líneas presentaron un tamaño y vigor menor, esto no impidió que florecieran, en la mayoría de los casos antes que los controles. En las siguientes campañas de análisis, la precocidad de las líneas se redujo, una única línea el segundo año y ninguna el tercero. Las líneas no mostraron un comportamiento muy homogéneo a lo largo del experimento, comportándose una misma línea de manera muy distinta en años consecutivos, por ejemplo línea 13 vio adelantada su floración los dos primeros años pero no el tercero.

En general, con la llegada del verano las plantas *35S:FaCO* dejaban de florecer al mismo tiempo que los controles, produciendo menos flores en los últimos días de la temporada, al igual que éstos. Por lo tanto, la sobre-expresión de *FaCO* no afectó de manera estable al inicio de la floración y no parece ser suficiente para inducir floración perpetua en ‘Camarosa’.

La expresión mayoritaria en hoja y focalizada en un pico justo al amanecer observada en *FaCO* es compatible con una función en la inducción de la floración, mediado por *FaFT3* en condiciones de SD, al menos en las variedades con floración estacional. Las plantas transgénicas *35S:FaCO* no florecieron antes de manera consistente durante los tres años del análisis, ni más que los controles durante los días largos del verano, por lo que *FaCO* no parece guardar ninguna relación con la floración perpetua en la fresa cultivada. Si bien el efecto sobre la floración no fue claro, la expresión ectópica de *FaCO* afectó al tamaño y la capacidad de reproducción asexual de la fresa, sugiriendo que el gen *FaCO* tiene una función en la regulación negativa (inhibición) del estolonado y el crecimiento vegetativo. Esto mismo se ha visto en la patata (González-Schain *et al.*, 2012; Abelenda *et al.*, 2016) y el chopo (Hsu *et al.*, 2012), respectivamente.

4.4 *FaFD2* forma parte de la familia de factores de transcripción bZIP de *Fragaria* × *ananassa*.

FLOWERING LOCUS D (FD) es un factor de transcripción bZIP, familia de proteínas que regulan muchos procesos en la plantas, desde defensa frente a patógenos, estrés abiótico, señalización hormonal o floración (Jacoby *et al.*, 2002; Nijhawan *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Baloglu *et al.*, 2014). La familia bZIP ha sido ampliamente identificada o predicha en muchos genomas, con 75 miembros identificados en *Arabidopsis* (Jacoby *et al.*, 2002), 89 en arroz (Nijhawan *et al.*, 2008), 92 en sorgo (Wang *et al.*, 2011), 64 en pepino (Baloglu *et al.*, 2014), 55 en *vitis* (Liu *et al.*, 2014) y 125 en maíz (Wei *et al.*, 2012). Sin embargo, muy pocos genes de esta amplia familia han sido caracterizados funcionalmente. Cuando se secuenció el genoma de la especie diploide *F. vesca* se predijeron un total de 37 factores de transcripción de la familia bZIP en esta especie (Shulaev *et al.*, 2011). Por lo tanto, esta familia de factores de transcripción parece

tener menos representantes en la fresa que en otras especies. Los factores de transcripción bZIP se han clasificado en 13 grupos (del A al L, y el S) dentro de las angiospermas, que representan 34 posibles grupos de ortólogos (Corrêa *et al.*, 2008). El TF AtFD pertenece al grupo A2 y las proteínas más similares de *Arabidopsis* AtAREB3 y AtDBBF4 pertenecen al A1.

El dominio bZIP da nombre a la familia y por tanto lo conservan todos los miembros de la misma. Este dominio, de 40 a 80 aa de longitud, está formado por dos regiones bien diferenciadas contiguas. La primera parte, responsable de la unión específica al ADN diana, está formada por 16 aa básicos (aproximadamente) que contiene una señal de localización nuclear seguida de un motivo de secuencia invariable (N-X₇-R/K-X₉) de unión a ADN. La segunda parte, llamada '*leucine zipper*', forma una cola antipática, creada por la repetición de aa hidrofóbicos (normalmente leucinas; L-X₆-L-X₆-L) y que ayudan a la interacción proteína-proteína, favoreciendo la formación de homo o heterodímeros (Jacoby *et al.*, 2002). El grupo de proteínas FD-like A2 poseen otros tres motivos muy bien conservados principalmente en dicotiledóneas (Tsuji *et al.*, 2013). El primero se encuentra en el extremo N-terminal, se le suele nombrar como motivo A y cuya secuencia es: (M/V)EEVWKDINLASLHD. El segundo motivo (llamado SLS) se encuentra en mitad de la proteína y su secuencia es: T(A/V)LSLN. Por último, en el extremo C-terminal se localiza el motivo SAP [de secuencia: (S/T)LXRXX(S/T)(A/T)(P/Q)F] (Tsuji *et al.*, 2013; Jacoby *et al.*, 2002). El motivo SAP juega un papel determinante en la funcionalidad de la proteína. La sustitución de la treonina (o serina) por alanina (en rojo en la secuencia) produce la pérdida de la funcionalidad de la proteína en *Arabidopsis* (Abe *et al.*, 2005) y arroz (Tsuji *et al.*, 2013).

Dos genes con similitud a AtFD fueron identificados en el genoma de *F. vesca* en este trabajo: gene14556-v1.0-hybrid y gene08566-v1.0-hybrid con similitudes del 47 y 40%, respectivamente. Comparaciones de las proteínas predichas para ambos genes con proteínas FD de otras especies mostraron, que si bien ambos pertenecen al grupo A2, el primero de ellos presentaba una secuencia mejor conservada con AtFD (**Figura 18**). Basándonos en estudios previos disponibles (Mouhu *et al.*, 2009), clonamos un gen de la especie cultivada *F. × ananassa*: FaFD2. Tanto FaFD2 como su ortólogo en *F. vesca* (gene08566 o FvFD2) conservan la secuencia del dominio bZIP en su totalidad, lo que los identifican como una proteína bZIP, sin embargo presentan algunas diferencias en los otros motivos propios del grupo A2. El motivo A presenta tres aa de diferencias, al igual que el motivo SLS, sin embargo los cambios se producen entre aa del mismo grupo químico. En lo que respecta al motivo SAP, FaFD2 presenta un motivo más corto pero conserva la serina susceptible de fosforilación e implicada en la unión a FT (Abe *et al.*, 2005; Tsuji *et al.*, 2013;) (**Figura 18**). Estudios similares recientes comparando numerosas proteínas FD ha mostrado

que la inmensa mayoría de secuencias tienen conservado dicho dominio (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Li y Dubcovsky, 2008; Taoka *et al.*, 2011; Tsuji *et al.*, 2013; Varkonyi-Gasic *et al.*, 2013; Susmilch *et al.*, 2015). Por tanto, FaFD2 pese a las diferencias, conserva el aa clave (serina o treonina) en la funcionalidad del motivo SAP. El análisis de la secuencia de FaFD2 en comparación con otras proteínas caracterizadas sugieren que podría tratarse de una proteína bZIP funcional en *Fragaria × ananassa*.

4.5 FaFD2 y FaFD presentan patrones de expresión muy distintos.

Los genes *FD-like* presentan patrones de expresión muy distintos, desde genes con expresión reducida casi por completo a un único tejido, como otros genes con expresión en la mayoría de los tejidos que conforman la planta (Liu *et al.*, 2014; Tsuji *et al.*, 2013; Nijhawan *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* la expresión de *FD* se restringe principalmente al núcleo de las células del meristemo apical (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Al analizar la expresión mediante qRT-PCR de los dos genes de fresa con mayor homología a *AtFD*, observamos que *FaFD* presentó un patrón muy similar de expresión en el cultivar de fresa 'Chandler' al descrito en *Arabidopsis* y guisante (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Susmilch *et al.*, 2015). Sin embargo *FaFD2* presentó un patrón de expresión más amplio. Mientras *FaFD* restringe su expresión a los meristemos (coronas diseccionadas) y en menor medida en fruto verde, *FaFD2* se expresó en todos los tejidos, con la mayor expresión en hoja joven, seguida de raíz y meristemos (**Figura 19**), este patrón de expresión también se ha observado en arroz donde *OzFD1* implicado en la activación de la floración (Taoka *et al.*, 2011) se expresa menos en raíz, mientras que en hoja y meristemo se expresa con la misma intensidad (Tsuji *et al.*, 2013) y en menor medida en trigo, donde no se tienen datos de la raíz (Li y Dubcovsky, 2008). Las diferencias mostradas por *FaFD2* nos inclinan a pensar que nos encontramos ante un gen distinto al que en un principio intentábamos caracterizar. Aun siendo distinto, la expresión relativa de *FaFD2* en corona fue también importante, aproximadamente un 50% de la observada en hojas, por lo que ambos genes podrían realizar la misma función o funciones complementarias, ayudando a la modulación e integración de distintas señales. Alternativamente, al presentar un dominio SAP más corto sería interesante comprobar en el futuro que la proteína conserva la capacidad de unión a los genes FT-like.

Por otro lado, según describen Abe *et al.* (2005) y Wigge *et al.* (2005), la expresión de *AtFD* no se ve afectada a lo largo del día, ni por el fotoperiodo. En *F. vesca* ocurre algo similar, los niveles de expresión no cambian con el fotoperiodo, pero son sensiblemente menores a temperaturas bajas (en un cultivar de SD, Rantanen *et al.*, 2015). Sin embargo en la fresa cultivada, hemos encontrado que al menos en las variedades con floración neutra ('Fern' y 'Selva') la expresión de *FaFD* si se ve alterada por el fotoperiodo, con una mayor expresión en condiciones de SD que en LD (**Figura 20**). El experimento efectuado no

nos permite discernir si el fotoperiodo afecta directamente o indirectamente a los niveles de mensajero de este gen. Además, las diferencias observadas en las variedades de DN fueron limitadas, de aproximadamente un 30%.

La expresión de *FaFD2* en hoja, raíz y corona también se vio afectada por el fotoperiodo tanto en las variedades de floración estacional, como en las de floración neutra. En todos los casos, la expresión fue al menos el doble en hojas y coronas en condiciones de SD comparada con LD (**Figura 21**). A lo largo del ciclo día/noche, salvo en el cultivar Selva en SD, la expresión de *FaFD2* fue menor tras cuatro horas del amanecer, recobrando los niveles máximos pasadas otras cuatro horas más, manteniéndose en similares valores de expresión el resto del día. Las mayores diferencias de expresión no fueron en ningún caso superiores al 50%. En el cultivar Selva, la expresión de *FaFD2* se mantuvo constante durante todo el día en condiciones de SD (**Figura 22**). Aunque las diferencias de expresión de *FaFD2* fueron modestas, el nivel más alto de expresión de *FaFD2* coincide con el periodo de luz solo en condiciones de LD en ambas variedades estudiadas y por tanto no coinciden con los niveles más altos de *FaCO* (**Figura 11**) que ocurren al final del periodo de oscuridad. La relevancia de estos resultados no parece clara en estos momentos más aun teniendo en cuenta que la expresión de *FaFD2* es mayor en SD, condiciones inductoras de la floración en *F. vesca*.

Aunque la función primordial de FD en *Arabidopsis* es actuar conjuntamente con FT para activar la floración en LD, se ha visto que tanto FD como su parólogo FDP, son capaces de unirse y actuar conjuntamente con TFL1, actuando en este caso como represor de la floración y asegurando la indeterminación del meristemo (Hanano y Goto, 2011). La interacción se produce de una manera competitiva, favoreciéndose la formación de cada complejo según la proteína que predomine. Por ejemplo, en *Arabidopsis* las altas temperaturas favorecen la formación del complejo FT/FD (Hanano y Goto, 2011). En fresa se han descrito tres proteínas FT-like (*Fv/FaFT1*, 2 y 3) y otras tres TFL1-like (Iwata *et al.*, 2012, Koskela *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2015). Por tanto, tanto FaFD como FaFD2 podrían unirse en el meristemo o en la hoja al menos a estas seis proteínas distintas, realizando en cada caso funciones distintas o incluso antagónicas, dependiendo de la proteína dominante en cada tejido y momento. En arroz, se han descrito tres genes con homología a *AtFD*, nombrados como *OsFD1*, *OsFD2* y *OsFD3* (Tsuji *et al.*, 2013). Al menos FD1 y FD2 son capaces de unirse a Hd3a (homólogo a *AtFT*) y realizar funciones diferentes: *OsFD1* actúa como inductor de la floración en SD y *FD2* está implicado en el desarrollo foliar, mostrando una clara divergencia funcional entre dos proteínas similares. La expresión de estos dos genes de arroz coincide con la mostrada por *FaFD2*, con expresiones similares en hoja, raíz y meristemo. *FaFD2* en hoja y meristemas, en condiciones de LD, podría estar reprimiendo la floración al unirse a FT1 y/o TFL1, mientras que *FaFD* o *FaFD2* podría promover la

floración al interactuar con FaFT3 en el meristemo bajo condiciones de SD. Se ha visto que los niveles de FvFD en meristemo se reducen cuando las temperaturas bajan de los 10 grados centígrados, lo que está asociado con una inducción de la floración independiente del fotoperiodo (Heide y Sønsteby, 2007) lo que induce a pensar que FvFD interviene en la regulación de la floración dependiente de fotoperiodo, donde Fv/FaFT3 parece tener un papel destacado (Iwata *et al.*, 2012, Koskela *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2015). Sin embargo, esta hipotética capacidad de interacción y/o competición entre las proteínas FT-like y TFL1-like por su unión a FD-like, demostrada en especies tan diferentes como *Arabidopsis* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Hanano y Goto, 2011), guisante (Susmilch *et al.*, 2015) u arroz (Tsuji *et al.*, 2013), debe ser corroborada en *Fragaria*, tal y como se hizo recientemente en rosa (Randoux *et al.*, 2014) mediante ensayos con levaduras y la técnica FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*). Aunque, al tratarse de especies tan cercanas filogenéticamente y con mecanismos tan similares en la regulación de la floración (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012; Randoux *et al.*, 2014; Rantanen *et al.*, 2014; Koskela *et al.*, 2016) es muy probable que así ocurra.

4.6 Efectos de la sobre-expresión de *FaFD2*.

La sobre-expresión de *FaFD2* en *F. × ananassa* no afectó al vigor o crecimiento vegetativo de las líneas transformadas. En los tres años de experimento, no se observaron diferencias en el tamaño de las hojas ni de las plantas, las líneas transgénicas estolonaron normalmente y pudieron ser multiplicadas vegetativamente (**Figura 24 y 25**). Como hemos explicado a lo largo de los resultados, durante el multiplicado de las líneas a evaluar al finalizar la primera campaña, se produjo en el invernadero de reclusión un brote muy importante de araña blanca. Esta plaga es muy difícil de controlar y erradicar, de hecho, los tratamientos continuos durante los tres años de análisis mejoraban temporalmente los síntomas al disminuir la plaga pero ésta volvía a reaparecer al cabo de un tiempo. La reproducción de esta plaga, se ve favorecida por temperaturas entre 20 - 30 °C y una humedad relativa superior al 80 % (condiciones habituales en el invernadero). Además, en regiones templadas, donde los inviernos son suaves, la plaga no hiberna y se reproduce todo el año, lo que explica los sucesivos rebrotes (el ciclo de vida dura unos 21 días) (Pritchard, 1949). Todas las plantas que componen el experimento se encontraban contiguas unas a otras, por tanto la plaga debió afectar a todas por igual. Sin embargo, las líneas *35S:FaFD2* han sido las que menos síntomas han presentado en lo que ha durado el experimento. Se sabe que en la familia bZIP existen proteínas encargadas de la respuesta frente a diversos estreses, entre ellos el estrés biótico provocado por patógenos (Liu *et al.*, 2014; Baloglu *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Nijhawan *et al.*, 2008; Jacoby *et al.*, 2002). Es por tanto posible que la sobre-expresión de *FaFD2* tuviera alguna influencia

en la tolerancia a esta plaga. En todo caso sería pequeña y no se ha realizado un estudio exhaustivo de la plaga que aporte luz en este sentido.

En lo que respecta a la inducción floral hemos comprobado que la sobre-expresión de este gen parece tener un efecto positivo en el adelanto de la floración, ya que fueron varias las líneas que florecieron antes que los controles (**Figura 23, 25 y 26**). Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de *35S:FaCO* el comportamiento de las líneas no ha sido muy estable en los tres años. Algunas de las líneas *35S:FaFD2* fueron las más precoces de todas las líneas de las distintas transgénicas, llegando en algunos casos a florecer 45 y 68 días antes, como la línea 18 durante el primer y el segundo año, respectivamente. En general, las plantas *35S:FaFD2* alargaron su fase reproductiva, al adelantar su floración, pero al igual que las líneas *35S:FaCO* cesaron de florecer al mismo tiempo que los controles. Por lo que la sobre-expresión de *FaFD2* no fue suficiente para inducir floración perpetua en un cultivar de floración estacional como 'Camarosa'. Esto tiene sentido en el contexto de FT-like y TFL1-like compitiendo por su unión e interacción con FD (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Hanano y Goto, 2011; Tsuji *et al.*, 2013; Susmilch *et al.*, 2015) y debido a la alta expresión de *FaTFL1* en LD (Koskela *et al.*, 2016).

Por tanto, los resultados obtenidos de la sobre-expresión del gen *FaFD2* en fresa sugieren que esté gen es capaz de acelerar la floración y puede representar una herramienta útil para generar fresas más precoces. La sobre-expresión sin embargo no afectó significativamente la floración en condiciones no inductoras (LD). Además, estudios adicionales en los que se controle la temperatura serían útiles para comprobar el efecto de las temperaturas altas sobre las líneas transgénicas, ya que se conoce el efecto negativo que tiene sobre la floración (Hytönen y Elomaa, 2011; Rantanen *et al.*, 2015). La expresión ectópica de un gen puede provocar efectos que normalmente no realiza debido a estar expresado de manera constitutiva. Estudios funcionales adicionales como el silenciamiento de *FaFD2* serían necesarios en un futuro para esclarecer su papel real en la inducción floral en la fresa.

4.7 Factores de transcripción MADS tipo MICK^C en *Fragaria vesca* y su papel en el desarrollo vegetativo y la floración.

En *Arabidopsis* los genes MICK^C tienen funciones muy diversas, intervienen en el desarrollo de la raíz (Tapia-López *et al.*, 2008), la semilla (kohler *et al.*, 2005) y el endospermo (Bemer *et al.*, 2008). Actúan como reguladores de ciclo celular y el destino meristemático (Gu *et al.*, 1998; Ferrándiz *et al.*, 2000; Melzer *et al.*, 2008). Algunos son genes homeóticos, integrantes del Modelo ABCDE y otros con responsabilidad en la inducción e inicio de la floración (Yanofsky *et al.*, 1990; Jack *et al.*, 1992; Mandel y Yanofsky,

1998; Ditta *et al.*, 2004; Adamczyk *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008). En *Arabidopsis* existen al menos nueve subfamilias con representantes implicados en estas dos últimas funciones (Smaczniak *et al.*, 2012; Becker y Theißen, 2002). A lo largo de este trabajo hemos hecho referencia a algunos de ellos, como *FLC*, *SVP*, *AGL24*, *AGL6* o *SOC1*. En el genoma de *F. vesca* existen predicciones génicas dentro de las todas las subfamilias relacionadas con la floración (Shulaev *et al.*, 2011), excepto en la subfamilia *FLC*, en la que no hemos encontrado ninguna predicción al igual que le ocurrió a Mouhu y colaboradores (2009). Debido a la alta sintenia existente entre *F. vesca* y *F. × ananassa* (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009; Tennessen *et al.*, 2014; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015) es esperable que la mayoría de los genes MICK^C se encuentren conservados en el género *Fragaria* (**Figura 27**). Esto no quiere decir que las funciones de los genes se encuentren igualmente conservadas. El gen *SOC1* es un ejemplo de las divergencias existentes entre *Arabidopsis* y el género *Fragaria*, como explicaremos más adelante.

4.8 *FaSOC1* es el gen ortólogo a *SOC1* en *Fragaria × ananassa*.

Alineando la secuencia proteica y mediante análisis filogenéticos, hemos conseguido mostrar como *FaSOC1* es un miembro de la subfamilia *SOC/TM3*, perteneciente a los genes *MADS* de dicotiledóneas. La secuencia proteica de *FaSOC1* contiene un dominio *MADS* muy conservado en el extremo amino terminal, seguido de un dominio *INTEVENIG*, un dominio *KERATIN-Like* (en su parte central), y un dominio *C-TERMINAL*, lo que le confiere la estructura modular típica de los TF *MADS* tipo MICK^C (Smaczniak *et al.*, 2012). Al final del dominio *C-TERMINAL* se observa un motivo, llamado motivo *SOC1*, muy conservado en *FaSOC1* y solo presente en la subfamilia *SOC1/TM3*, este motivo juega un papel determinante en la funcionalidad y especificidad de la proteína (Vanderbussche *et al.*, 2003). Además, sobre la secuencia encontramos conservados residuos relacionados con la localización celular, la fosforilación y la glucosilación de la proteína (Lei *et al.*, 2013). Al realizar análisis filogenéticos, observamos como *FaSOC1* se localiza en el mismo clado que proteínas *SOC1* caracterizadas en otras rosáceas, entre ellas *F. vesca* (*FvSOC1a* en la **Figura 28**; Mouhu *et al.*, 2013) y dentro de la subfamilia *SOC/TM3*, de dicotiledóneas. Todos estos datos indican que el gen *FaSOC1* de fresa es un gen *MADS* tipo MICK^C con todos sus dominios funcionales y el ortólogo a *SOC1* en *F. × ananassa*.

4.9 Implicaciones del patrón de expresión observado en *FaSOC1*.

En *Arabidopsis* el gen *SOC1* se expresa fundamentalmente en el meristemo apical donde actúa como un potente activador floral e integrando señales provenientes de varias rutas metabólicas (Yoo *et al.*, 2005; Lee y Lee, 2010; Immink *et al.*, 2012; **Figura 1**). En *F. × ananassa* cv. Chandler, *FaSOC1* presentó altos niveles de expresión en hoja, raíz y corona (ligeramente menores en este último tejido), siendo bajos en flores y frutos (**Figura 30**).

Patrones de expresión muy similares se han encontrado en otras especies de rosáceas como *F. vesca* (Mouhu *et al.*, 2013), *Prunus armeniaca* (Trainin *et al.*, 2013) o *Pyrus pyrifolia* (Ubi *et al.*, 2013) y especies como el kiwi (Voogd *et al.*, 2015), el chopo (Ceske *et al.*, 2003) o el cedro japonés (Katahata *et al.*, 2013). La alta expresión en tejidos diferentes al meristemo apical, presente en numerosas plantas, nos indicaría que *SOC1* ejerce funciones adicionales y/o diferentes a las realizadas en *Arabidopsis*. Por ejemplo, en chopo *PTM5* (homólogo a *SOC1*) parece estar implicado en el desarrollo del sistema vascular (Ceske *et al.*, 2003) así como en kiwi, la expresión ectópica de varios genes *SOC1*-like (*AcSOC1e, i y f*) no adelantaron la floración y además *AcSOC1i* redujo la dormancia de las yemas, en ausencia de vernalización.

Recientemente, Lei *et al.* (2013) identificaron un gen idéntico al nuestro en el cultivar ‘Camarosa’. Al analizar la secuencia, observamos que únicamente presentan un SNP de diferencia y que éste no se traduce en diferencias aminoacídicas, se trata por tanto de un SNP silencioso entre dos alelos de un mismo gen. La sobre-expresión ectópica de *FaSOC1* (y también la de *FvSOC1*) fue suficiente para adelantar la floración de *Arabidopsis* (Lei *et al.*, 2013; Mouhu *et al.*, 2013). Lo mismo ocurre con los ortólogos a *AtSOC1* del cedro japonés (Katahata *et al.*, 2013), *vitis* (Sreekantan y Thomas, 2006) o kiwi (Voogd *et al.*, 2015). Aun así, en *F. vesca*, *SOC1* está implicado en la represión de la floración y la activación del crecimiento vegetativo (Mouhu *et al.* 2013). La sobre-expresión de *FvSOC1* reprime la floración en SD, mientras que el silenciamiento causa floración perpetua. Análisis moleculares de estas transgénicas revelaron que *FvSOC1* activa la expresión de *FvTFL1* en el meristemo y este en última instancia reprime la floración (Mouhu *et al.*, 2013; Rantanen *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que los genes *SOC1*-like de rosáceas, aunque presenten la misma estructura proteica y conserven todos los dominios y motivos propios del grupo, han divergido funcionalmente, pasando a realizar otras funciones. En el caso del género *Fragaria* totalmente opuestas a las descritas en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2005; Lee y Lee, 2010; Immink *et al.*, 2012).

Al contrario que ocurre en *Arabidopsis*, donde el pico de expresión se produce en condiciones inductoras de floración (al tratarse de un activador de la floración), la expresión *FvSOC1* es mayor en condiciones no inductoras de floración (LD) (Mouhu *et al.*, 2013). En este trabajo, hemos puesto de manifiesto como en la fresa cultivada *FaSOC1* también presenta mayor expresión en condiciones de día largo en hoja, raíz y corona (**Figura 31**), al igual que ocurre en *F. vesca*. Los cuatro cultivares analizados mostraron el mismo patrón de expresión. Al producirse el mismo comportamiento en variedades con distinto comportamiento frente al fotoperiodo, podemos concluir que *SOC1* no es responsable de estas diferencias varietales, ni en *F. vesca* (*FvSOC1*) ni en la fresa cultivada (*FaSOC1*).

También hemos confirmado que la expresión de *FaSOC1* no varía a lo largo del ciclo día/noche, presentando mínimas diferencias a lo largo del día, tanto en SD como LD (**Figura 32**). Mouhu *et al.* (2013) describen una pequeña bajada de expresión durante las horas centrales del día, en condiciones de LD mientras la expresión se mantiene invariable en SD. Al observar en detalle los datos aportados por Mouhu (2013), no es posible asegurar esto, ya que la variabilidad de las medidas de LD hace imposible establecer diferencias significativas entre los puntos de muestreo.

4.10 La sobre-expresión de *FaSOC1* retrasa la floración e induce el crecimiento vegetativo en *Fragaria* × *ananassa*.

‘Camarosa’ es un cultivar de floración estacional de SD, su floración se induce por tanto en otoño y se inicia con la entrada del invierno. Al llegar los días largos, la floración se interrumpe, la planta crece vegetativamente y comienza a estolonar (**Figura 4**). Durante los tres años que se han evaluado las líneas transgénicas *35S:FaSOC1* hemos puesto de manifiesto como este ciclo de crecimiento normal se ve alterado por la sobre-expresión de *FaSOC1* (**Figura 33, 35, 36 y 38**). La sobre-expresión de *FaSOC1* retrasa la floración, favorece el crecimiento vegetativo y la formación de estolones. El efecto sobre la floración se repitió durante 2 de los 3 años en al menos 2 de las líneas analizadas. En cuanto al efecto positivo de *FaSOC1* sobre el estolonado, llegamos a observar plantas que estolonan antes y durante la floración, con peciolo e inflorescencias alargadas, un crecimiento vegetativo acentuado y continuo. El comportamiento observado en *FaSOC1* es opuesto al observado en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2005; Lee y Lee, 2010; Immink *et al.*, 2012), *Sinapis alba* (Menzel *et al.*, 1996), arroz (Lee *et al.*, 2004) o incluso en la especie perenne *Cardamine flexuosa* (Zhou *et al.*, 2013), especies donde *SOC1* actúa como un importante activador de la floración. Al igual que lo que hemos observado en *F. × ananassa*, la sobre-expresión de *FvSOC1* reprime la floración bajo SD en *F. vesca*, mientras que la inhibición de *FvSOC1* (mediante ARN interferente) induce floración perpetua (Mouhu *et al.*, 2013), igual que ocurre en las accesiones de *F. vesca* con el represor de la floración *FvTFL1* mutado (Iwata *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012). Mouhu *et al.* (2013) comprueban como la expresión de *FvTFL1* se relaciona positivamente con la expresión de *FvSOC1*, aumentando en las plantas que sobre-expresan *FvSOC1* y disminuyendo de igual forma en las líneas inhibidas mediante ARN interferente, mientras que *FvAP1* sufre la regulación opuesta. A la vista de estos resultados Mouhu (2013) concluyen que *FvSOC1* actúa como activador de *FvTFL1* para reprimir *FvAP1* y por tanto la floración bajo LD; mientras que tanto *FvSOC1* como *FvTFL1* son reprimidos en SD produciéndose la floración. Nuestros resultados indican que este modelo podría estar ocurriendo también en *F. × ananassa*, ya que la sobre-expresión de *FaSOC1* retrasó la floración en SD, aunque no consigue suprimirla por completo. Es necesario un estudio para corroborar la actuación de *FaSOC1* sobre *FaTFL1* y *FaAP1* pero al tratarse de especies

tan próximas filogenéticamente y con una sintenia tan acentuada (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2009) es muy probable que los mecanismos se conserven. Otra posible explicación del retraso en la floración observado, sería la inducción de la síntesis de giberelinas y el efecto positivo que ejercen sobre el crecimiento vegetativo, como explicaremos a continuación.

En la fresa, la floración está íntimamente relacionada con cambios en el crecimiento vegetativo dentro del ciclo anual de crecimiento (Hytönen y Elomaa, 2011). Durante los días largos del verano, los meristemos axilares se transforman en estolones, mientras que en condiciones de SD, estos mismos meristemos dan lugar a coronas secundarias (Konsin *et al.*, 2001; Hytönen *et al.*, 2004 y 2009). En fresa se sabe que estos cambios anuales están controlados en parte por las giberelinas, las cuales activan el crecimiento vegetativo, promueven la elongación de los peciolo (Guttridge y Thompson, 1964; Wiseman y Turnbull, 1999a), y la diferenciación de los meristemos axilares a estolones (Hytönen *et al.*, 2009) e inhiben la floración (Braun y Kender, 1985; Braun y Garth, 1986). Sumado al efecto sobre el retraso de la floración, las líneas *35S:FaSOC1*, ven alterado el crecimiento vegetativo y la producción de estolones (**Figura 36**). Mientras los controles dejaban de estolonar con la llegada de los días cortos, las líneas transgénicas continuaban estolonando, incluso mientras los controles florecían, llegando algunas transgénicas a estolonar a la vez que florecían. Lo que nos demuestra que cuando se rompe el control fotoperiódico sobre *SOC1* el crecimiento vegetativo se reactiva en SD, mientras que la floración se retrasa. Por tanto, el fenotipo observado en las líneas transgénicas sugiere que *FaSOC1* afecta la ruta de biosíntesis de giberelinas, promoviendo su biosíntesis y/o acumulación, al igual que ocurre en *F. vesca* (Mouhu *et al.*, 2013). Con el objetivo de confirmar la relación entre *FaSOC1* y las giberelinas (a la vista de los resultados) sería interesante medir la actividad de los genes con mayor importancia en la degradación y síntesis de esta hormona, como son GA2ox y GA3ox, en las líneas transgénicas *35S:FaSOC1*.

Aunque hemos explicado ambos procesos por separado: (i) La inducción de *TFL1* vía *SOC1* y (ii) la activación de la síntesis de giberelinas mediada por *SOC1*; lo cierto es que no son excluyentes el uno del otro. Lo más probable es que ambos se produzcan y actúen a la vez, regulando la floración estacional y el crecimiento vegetativo, en el género *Fragaria* y otras *Rosaceas* (Randoux *et al.*, 2012).

4.11 La sobre-expresión de *FaSOC1* altera la morfología floral y dificulta la correcta maduración del receptáculo y los aquenios.

SOC1 interacciona con muchas otras proteínas MADS y se une a los promotores de múltiples reguladores florales en *Arabidopsis* (Immink *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* *SOC1* eleva su expresión al inicio del desarrollo de los meristemos florales, pero

su señal desaparece cuando la flor comienza a desarrollarse (Borner *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). La expresión de *SOC1* al principio previene la activación precoz de genes homeóticos tipo B y C (Liu *et al.*, 2009; Gregis *et al.*, 2009) y la rápida represión de su expresión es mediada por AP1 (Liu *et al.*, 2009). La represión en las primeras etapas de formación de la flor es esencial para que el desarrollo de la misma no se vea afectado (Borner *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). Aunque anteriormente hemos descrito como *FaSOC1* regula la inducción de la floración de manera opuesta a su ortólogo en *Arabidopsis*, también hemos demostrado que los dominios y motivos de la proteína *FaSOC1* se encuentran totalmente conservados (**Figura 29**). Por lo que no podemos descartar que otras actividades descritas para este gen en *Arabidopsis* se conserven en *Fragaria*. Nuestro estudio ha mostrado una baja expresión de *FaSOC1* en la flor en fresa (**Figura 30**). Aunque no se ha llegado a medir la expresión en flores en las líneas *35S:FaSOC1*, es esperable que bajo la acción del promotor 35S de virus del mosaico del tabaco, se haya incrementado la expresión en este tejido. Así, la sobre-expresión de *FaSOC1* en ‘Camarosa’ afectó negativamente a la morfología floral (**Figura 34, 37 y 39**). Modificando principalmente al tamaño de los sépalos (primer verticilo, y responsabilidad de genes tipo A y B) junto con el tamaño y la forma de los pétalos (segundo verticilo, y responsabilidad de genes tipo B y C). Estos efectos parecen estar en relación con una modificación en los niveles de expresión de *FaSOC1* en la flor.

Las hormonas juegan un papel muy importante en la maduración del receptáculo y el aquenio de fresa. Entre las hormonas que intervienen en el proceso nos encontramos con la auxina (IAA) (Nitsch, 1950; Archbold y Dennis, 1984; Medina-Escobar *et al.*, 1997; Aharoni *et al.*, 2002; Symons *et al.*, 2012), el etileno (Merchante *et al.*, 2013), el ácido abscísico (ABA, Jia *et al.*, 2011), el jasmonato (Concha *et al.*, 2013) o los brasinoesteroides (Bombarely *et al.*, 2010) y por último también las giberelinas (Csukasi *et al.*, 2011 y 2012; Vallarino *et al.*, 2015). Tratamientos con giberelinas activas (GA3) reducen la actividad de las enzimas clorofilasa y la peroxidasa, que intervienen en la maduración de los frutos de fresa (Archbold y Dennis, 1985). Además, tratamientos con GA3 retrasan significativamente la evolución del color por la no acumulación de antocianinas (Martínez *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 2009) en los frutos tratados. El efecto negativo de la acumulación de giberelinas observado sobre la maduración del fruto, podría explicar el fenotipo encontrado en las líneas *35S:FaSOC1*, en las que los frutos no llegan a completar su maduración, permanecen duros y no alcanzan la coloración roja. Sería por tanto muy interesante en un futuro medir los niveles de giberelinas y/o de genes responsables de su biosíntesis en distintos tejidos y a lo largo del desarrollo de los frutos de las plantas transgénicas *35S:FaSOC1*.

4.12 Modelo de regulación de *FaSOC1* en la floración y el estolonado de fresa.

Los resultados obtenidos tras la caracterización de *FaSOC1* y su sobre-expresión mediante el promotor constitutivo *CaMv35S* en 'Camarosa' han mostrado gran similitud con el fenotipo observado por Mouhu *et al.* (2013) en *F. vesca*. Teniendo en cuenta todos estos resultados, la **Figura 55** muestra un posible mecanismo de acción para *SOC1* sobre las rutas/genes que regulan la inducción de la floración y el estolonado en el género *Fragaria*. En este modelo, el fotoperiodo modifica la expresión de *SOC1*, induciéndola en LD y/o reprimiéndola en SD. El efecto del fotoperiodo sobre *SOC1* es indirecto ya que posiblemente distintos genes CO y FT/FD actúen antes en esta ruta. Este cambio de expresión promueve la alternancia entre la fase reproductiva y el crecimiento vegetativo en las variedades de floración estacional, inhibiendo floración en LD y activando el crecimiento vegetativo junto con el estolonado (vía giberelinas).

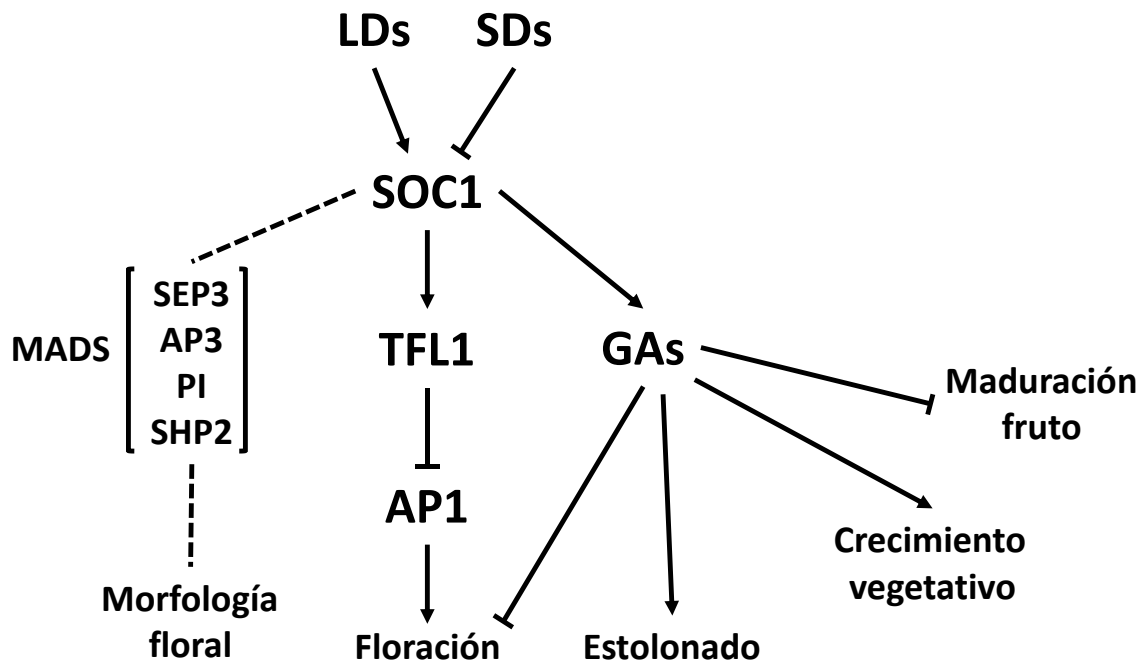


Figura 55. Modelo de actuación propuesto para *FaSOC1*. Las flechas indican activación y las barras represión. La línea discontinua indica interacción.

4.13 *FaAGL6* es el gen ortólogo a *AGL6* en *Fragaria* × *ananassa*.

Alineando la secuencia proteica y mediante análisis filogenéticos, hemos mostrado que *FaAGL6* es un miembro de la subfamilia AGL6, perteneciente a los genes MADS (**Figura 40**). La secuencia proteica de *FaAGL6* contiene un dominio MADS muy conservado en el extremo amino terminal, seguido de un dominio INTEVENIG menos conservado, un dominio KERATIN-Like (en su parte central), y un dominio C-TERMINAL (algo variable entre las diferentes especies), lo que le confiere la estructura modular típica de los TF MADS tipo

MICK^C (Smaczniak *et al.*, 2012). Ohmori *et al.* (2009) describen dos motivos cortos (de diez aminoácidos, cada uno) muy conservados en el dominio C-terminal de monocotiledóneas y *Arabidopsis*. Estos dos motivos son muy parecidos a los descritos por Zahn y colaboradores (2005) en la subfamilia de factores de transcripción SEPALLATA. El motivo I (de secuencia DCEPFLQIGY), presente tanto en *AtAGL6* como *AtAGL13*, se encuentra conservado tanto en *FaAGL6* como en *F. vesca* (Fvgene19428-v1.0-hybrid; Shulaev *et al.*, 2011), el motivo II (de secuencia ETNFVQGWVL) solo está presente en *AtAGL6* (ya que *AtAGL13* no conserva los últimos 4 aminoácidos), este cambio marca las diferencias entre los dos principales integrantes de la subfamilia AGL6 (**Figura 41**). Tanto el motivo I como la región entre ambos motivos poseen capacidad de activación transcripcional, pero es el motivo II, el que presenta una mayor capacidad en este sentido (Ohmori *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en la secuenciación, alineamiento y filogenia (**Figura 40 y 41**), nos indican que efectivamente hemos clonado el gen ortólogo a *AtAGL6* en el cultivar ‘Selva’ de fresa y que al presentar conservados todos los dominios importantes para la funcionalidad de la proteína (en especial el motivo II), es muy probable que *FaAGL6* sea un TF MADS funcional en la fresa cultivada.

4.14 *FaAGL6* se expresa mayoritariamente en la flor cerrada de *Fragaria* × *ananassa*.

AtAGL6 se identificó originariamente en una búsqueda de genes con expresión específica en óvulos (Schauer *et al.*, 2009). Aunque el gen se expresa mayoritariamente en este órgano floral, estudios posteriores confirmaron que *AtAGL6* también se expresa en hoja durante la fase vegetativa de la planta (Yoo *et al.*, 2011a). Según Yoo *et al.* (2011a y b) *AtAGL6* actúa como inductor floral al desactivar la expresión de *FLC* (y sus homólogos) y activar la expresión de *AtFT* en hoja, así como en la regulación del reloj circadiano vía *ZEITLUPE* (*ZTL*). La expresión en hoja de *AtAGL6* fue similar en SD y LD, por lo que no está regulado por el fotoperiodo en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2011a; Yoo *et al.*, 2011b). Sin embargo, nosotros no hemos encontrado expresión en hoja, ni durante el clonado del gen, que tuvo que realizarse sobre tejido meristemático, ni en los estudios de expresión diferencial, en ninguno de los cultivares analizados (**Figura 42 y Figura 43**). Los niveles más altos de expresión relativa los encontramos en la flor cerrada y el fruto verde, siendo estos cinco veces superiores a los obtenidos en la corona y fruto blanco (en fruto rojo fueron aun menores) (**Figura 42**). Este patrón de expresión hace difícil que *FaAGL6* actúe como un activador de la floración en hoja, ni que tenga presencia como regulador del reloj circadiano como ocurre en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2011a; Yoo *et al.*, 2011b). Por otra parte, hemos comprobado como en el meristemo, la expresión de *FaAGL6* cambia según el fotoperiodo, siendo más alta en condiciones de SD en los cuatro cultivares analizados, incluso en dos de ellos (‘Chandler’ y ‘Selva’) no se encontró expresión en el meristemo en LD (**Figura 43**).

Aunque, la actividad como activador de la floración en el meristemo no puede ser descartada por los experimentos realizados, esta no ha sido descrita aún en *Arabidopsis*, donde la expresión en el meristemo está relacionada con el desarrollo de los órganos laterales y el tallo (Koo *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). Por lo que, al coincidir la expresión de *FaAGL6* en fresa con las condiciones inductoras de la floración y aumentar su expresión en flor, parece más probable que esta inducción de *FaAGL6* sea consecuencia de la inducción de otros genes importantes en este cambio y que su función en *Fragaria* esté más relacionada con el propio desarrollo floral.

Perfiles de expresión similares al encontrado en la fresa cultivada han sido descritos (para homólogos a *AGL6*) en otras especies, con altos niveles de expresión en los órganos florales, bajos en meristemo y aún más bajos en la hoja. Por ejemplo en uva (*VvAGL6/MADS3*), naranjo (*CcAGL6/MADS11*) y cedro japonés (*CjMADS14*) la expresión es mayoritaria en órganos reproductores (y zarcillos en el caso único de uva) y muy baja en las hojas, (Viaene *et al.*, 2010; Katahata *et al.*, 2014). Mientras que en kiwi existen dos parálogos, con diferencias en su expresión: *AcALG6a* presenta mayor expresión en los meristemos y similares niveles en hoja y flor; mientras que *AcAGL6b* se expresa el doble en la flor que en el meristemo y muy poco en la hoja (Viaene *et al.*, 2010). En peral, perteneciente al grupo de las *Rosaceas* como la fresa, se observa una elevada expresión en la flor completa y los primeros estadios del fruto (Ubi *et al.*, 2013), al igual que hemos encontrado nosotros en la fresa cultivada.

Con la excepción del gen *APETALA2 (AP2)* de *Arabidopsis*, gen homeótico de tipo A, todos los genes que intervienen en el modelo ABCDE de organogénesis floral pertenecen a la familia MADS tipo II, concretamente se tratan de genes pertenecientes al grupo MICK^C (Henschel *et al.*, 2002). La subfamilia *SQUAMOSA (SQUA)*, está considerada como el grupo de genes que realiza las funciones de tipo A, al menos en *Brassicaceae* (Shan *et al.*, 2007). La función B, la realizan los genes pertenecientes a la subfamilia *DEFICIENS/GLOBOSA (DEF/GLO)*, las funciones C y D la realizan los genes de la subfamilia *AGAMOUS (AG)* y la función E, la llevan a cabo los genes de la subfamilia *SEPALLATA (SEP)* (Zahn *et al.*, 2005; Dreni *et al.*, 2011; Dreni y Kater, 2014; Dreni *et al.*, 2016). Dentro de los genes MICK^C existen otros muchos genes que no forman parte (al menos no se ha demostrado todavía) del modelo ABCDE. Sin embargo, algunos muestran una relación muy cercana con las familias *SQUA*, *DEF/GLO*, *AG* o *SEP* (Dreni *et al.*, 2016). Por ejemplo, la subfamilia *AGL12*, cercana a *AG* (responsable del desarrollo de los estambres, carpelos y óvulos), tiene funciones en el desarrollo de las raíces y la transición floral (Tapia-López *et al.*, 2008). La subfamilia de genes *AGL6*, es otro ejemplo. En este caso, *AGL6* es una familia muy cercana a *SEP*, ambas subfamilias presentan dos motivos muy conservados en el dominio C-terminal y muy similares entre sí (Ohmori *et al.*, 2009), que pueden funcionar como los motivos

relacionados con la activación transcripcional de ambas subfamilias (Zahn *et al.*, 2005, Ohmori *et al.*, 2009). El gen homólogo a *AGL6* en arroz (*OsMADS6*) es probablemente el *AGL6*-like mejor caracterizado en las plantas con semillas. Fue identificado hace más de quince años por su habilidad para interactuar con otros TF de arroz, como: *SEP*, *SQUA* y *AGL6* (Moon *et al.*, 1999), pero la caracterización funcional no se realizó hasta 2009 por Ohmori y colaboradores. *OsMADS6* se expresa en todos los tejidos de la flor excepto los estambres (Ohmori *et al.*, 2009). El mutante *osmads6* presenta defectos en todos los tejidos donde *OsMADS6* se expresa (Ohmori *et al.*, 2009) llegando a provocar esterilidad al afectar al desarrollo del ovulo (Li *et al.*, 2010). Los defectos encontrados en el mutante *osmads6* son los mismos encontrados en los mutantes del gen *OsMADS1* (*SEP*), incrementándose los efectos en el doble mutante (Ohmori *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Tanto *OsMADS6* como *OsMADS1* forman heterodímeros (Moon *et al.*, 1999) y ambos son necesarios para la expresión correcta de genes tipo B, C y E, especialmente durante las primeras etapas de formación de la flor (Ohmori *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2015). Sin embargo, en petunia, aunque la expresión del gen homólogo (*PhAGL6/MADS4*) está específicamente restringida a los órganos florales, el mutante *phagl6* no muestra defectos florales (Rijpkema *et al.*, 2009). Si se observaron modificaciones en el doble mutante *phagl6/fbp2* (mutado también en el gen *FBP2* de la subfamilia *SEP*), los pétalos se vuelven verdes, parecidos a sépalos, y se reduce el tamaño de la corola (Rijpkema *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, la sobre-expresión de *AGL6* también afecta a la morfología floral, ya que las flores son sustituidas por brácteas (Koo *et al.*, 2010). Los estudios llevados a cabo tanto en arroz, petunia y *Arabidopsis*, concluyen que *AGL6* es un gen homeótico, que interacciona con otros genes MADS a la hora de formar los diferentes órganos de la flor. Además, *AtAGL6* interviene en la inducción floral de *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2011a; Yoo *et al.*, 2011b). Por tanto, no es extraño pensar que en *F. × ananassa*, a la vista de la elevada expresión encontrada en flores y la ausencia de expresión en las hojas (**Figura 42**), *FaAGL6* no intervenga en la inducción de la floración, tratándose más bien de un gen homeótico, relacionado con la organogénesis floral como integrante del modelo ABCDE.

4.15 La sobre-expresión de *FaAGL6* no adelantó la floración en *Fragaria × ananassa*.

Durante el primer año de cultivo de las líneas transgénicas, siete líneas (de nueve analizadas) vieron adelantada su floración en comparación con los controles. Al año siguiente, solo la línea 3 presentó un adelanto de su floración. En el último año encontramos que ninguna línea floreció antes que los controles. Estos resultados, un tanto dispares (teniendo en cuenta que durante el primer año el número de réplicas por línea nos impide tener datos estadísticos), nos sugieren que la sobre-expresión de *FaAGL6* no tiene un efecto claro sobre la inducción de la floración. Los resultados del primer año eran

prometedores, pero conforme el experimento avanzó los efectos fueron menores. Por lo que se conoce de la inducción de la floración de AGL6 en *Arabidopsis* esta se produce en la hoja, induciendo a *AtFT* a la vez que reprime a la familia *FLC* (Yoo *et al.*, 2009). Si este mecanismo se conservara en la fresa cultivada, la sobre-expresión de *FaAGL6* en hoja, un tejido donde no se expresa (**Figura 42 y 43**), tendría un efecto bastante acusado que resultaría en un adelanto en la floración e incluso un alargamiento de la misma por el final. Lo primero no ha quedado nada claro y lo segundo no se ha producido en ninguna temporada.

El primer año, se observó también un aumento pequeño en el número de flores producidas, pero de nuevo, al año siguiente (ya con datos estadísticos, **Figura 46**) no se repitió.

Como hemos apuntado en el punto anterior, los perfiles de expresión de *FaAGL6* y la función realizada por este gen en arroz y petunia, nos inclina a pensar en su función como gen homeótico. Sin embargo, nosotros no hemos observado ninguna alteración en la morfología floral de la fresa, en ninguna de las líneas analizadas, durante la duración del estudio. La deficiencia de AGL6 en arroz produce severas alteraciones florales (Ohmori *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010) pero en petunia no se ha asociado ningún fenotipo a la mutación del gen (Rijpkema *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, la sobre-expresión de *AtAGL6* fusionada a su promotor, produce la aparición en la flor de estambres estériles parecidos a brácteas (Koo *et al.*, 2010). La expresión constitutiva de *FaAGL6* en fresa no afectó al desarrollo floral por lo que es posible que la función de *FaAGL6* sea enmascarada por la acción redundante de genes de la subfamilia SEP, muy cercana y con similar estructura a AGL6 (Ohmori *et al.*, 2009), como ocurre en petunia y arroz (Dreni *et al.*, 2016).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 3

Identificación de marcadores moleculares ligados al estolonado en *Fragaria × ananassa*.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 3: Identificación de marcadores moleculares ligados al estolonado en *Fragaria × ananassa*.

1. Objetivos

El objetivo general de este capítulo ha sido profundizar en el conocimiento del control genético del estolonado en la fresa cultivada (*Fragaria × ananassa*).

Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Análisis de la segregación del estolonado en una población de mapeo F₂ e identificación de marcadores AFLPs, SSR y SNP ligados a este carácter.
- Identificar la posición en el genoma de la fresa cultivada del *locus R* mediante la construcción de un mapa de ligamiento en la población de muestreo 'Endurance' × 'Parker' utilizando los marcadores moleculares identificados.
- Identificar el origen del defecto genético en el estolonado en la población 'Endurance' × 'Parker'.
- Identificación de genes diferencialmente expresados entre plantas F₂ estolonantes y no estolonantes, mediante la cuantificación del transcriptoma de la corona usando RNA-seq.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2 Material y Métodos.

2.1. Población de muestreo 'Endurance' × 'Parker'.

Los estudios se llevaron a cabo sobre una población de fresa segregante para el carácter estolonado. Para la obtención de dicha población se cruzaron dos cultivares comerciales de *F. × ananassa*: 'Endurance' como parental femenino y 'Parker' como parental masculino, obteniéndose una población F_1 . Para obtener la población F_2 segregante, formada por 144 plantas, se auto-fecundó una única planta de la progenie F_1 , concretamente el individuo PS6-2. La población F_2 , junto con los parentales y la F_1 fueron crecidas en contenedores en umbráculo, simulando las condiciones de crecimiento en campo. En cada contenedor con 0,5 m³ de sustrato (con una proporción turba:arena de 7:3) se plantaron seis individuos de la F_2 . Los individuos de la población fueron evaluados en su capacidad de estolonado durante cinco campañas: 2008, 2009, 2010, 2012 y 2013. A lo largo de los seis años en los que la población se mantuvo en el invernadero murieron un total de diecisiete plantas de la población de muestreo: Los tres primeros años de toma de datos, murieron siete líneas y en los tres años posteriores, conforme la población envejecía, murieron diez plantas más. Entre las campañas de 2012 y 2013 se procedió a una renovación de la población. Las plantas estolonantes fueron renovadas mediante estolones y colocadas sobre sustrato nuevo. Las plantas que no consiguieron estolonar se trasplantaron a partir de una corona, sin sufrir daños, a nuevo sustrato.

Sobre la población segregante se realizaron cuatro experimentos. Con los datos de estolonado de las tres primeras campañas se realizó un experimento de mapeo del *locus R* mediante AFLPs. Con los datos de estolonado de la campaña 2012, se continuó con un barrido de la población mediante marcadores microsátélites, con el objetivo de enriquecer en marcadores el mapa genético del *locus R*. Complementando al barrido con marcadores SSRs se realizó una búsqueda de marcadores SNP polimórficos. Por último, durante la campaña 2013 se realizó un análisis de expresión mediante secuenciación masiva (RNA-seq) en individuos contrastantes de la población.

2.2 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN genómico de los 144 individuos de la población de mapeo F_2 , de los parentales y de línea F_1 PS6-2, se usó una modificación del método de extracción con CTAB (Doyle, 1990) (ver Material y Métodos del capítulo 2, apartado 2.7.5).

2.3 Marcadores AFLPs.

Las muestras para AFLPs se prepararon según el protocolo de Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones. La digestión con enzimas de restricción se realizó sobre 500 ng de ADN genómico de cada individuo usando dos enzimas de restricción. Al usarse dos enzimas de restricción con temperaturas de actuación diferentes, la digestión tuvo que ser dividida en dos pasos. En el primer paso se usó *Tru1I* (isoesquizómero de *MseI*) y se incubó el ADN genómico durante 120 min a 65 °C, en un volumen final de 40 µL. A continuación, se procedió a la segunda digestión con *Eco RI* añadiendo 5 µL de mezcla de reacción a la reacción anterior e incubando la muestra de reacción durante 90 min a 37 °C (**Tabla 9**).

	Tru 1I	Eco RI
Buffer OPA 5x*	8 µL	1 µL
bsa 100x**	0,2 µL	0,025 µL
DTT 100 mM	2 µL	0,25 µL
E. R. (10 u/µL)	0,5 µL	0,6 µL
H₂O miliQ estéril	19,3 µL	3,125 µL
ADN (500 ng)	10 µL	-

Tabla 9. Productos y volúmenes usados en cada digestión, para la enzima Tru 1I y Eco RI. * OPA (50 mM de tris-acetato; 50 mM de acetato magnésico; 250 mM de Acetato potásico. ** bsa 100x de Biolabs, 10 mg/mL.

A continuación sobre los 45 µL de la reacción de digestión, se ligaron los adaptadores específicos para cada enzima usando una enzima ligasa (T4 DNA Ligasa, Fermentas) usando para cada muestra, 5 µL de la mezcla de reacción detallada en la **Tabla 10**. La reacción de ligación se realizó a 37 °C durante 3 horas.

Reacción de Ligación	
Buffer ligación 5x	1 µL
T4 DNA Ligasa (3 u/ µL)	2 µL
Adaptador Eco RI (5 µM)	1 µL
Adaptador Tru 1I (50 µM)	1 µL

Tabla 10. Volúmenes de los reactivos usados en la reacción de ligación.

Cada producto de Digestión-Ligación (50 µL = 45 µL + 5 µL) se diluyó 5 veces (1:5) en agua para realizar sobre él la pre-amplificación posterior. En las reacciones de pre-amplificación se usó una combinación de cebadores complementarios a los adaptadores con un nucleótido adicional en su extremo (cebadores+1). La pre-amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL, según la mezcla de reacción detallada en la **Tabla 11**.

Pre-amplificación	
Buffer PCR 10x	2 μ L
H ₂ O miliQ estéril	10,2 μ L
dNTPs (5 mM)	0,8 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ L
Cebador +1 Eco RI (50 ng/ μ L)	0,6 μ L
Cebador +1 Tru 1I (50 ng/ μ L)	0,6 μ L
Taq Biotools (5 u/ μ L)	0,2 μ L
ADN (Dil 1:5 Dig-Lig)	5 μ L

Tabla 11. Volúmenes de los reactivos usados en la reacción de pre-amplificación.

La reacción de pre-amplificación se realizó en un termociclador iCycler (Biorad Laboratories) usando el siguiente programa:

94 °C	30 seg	1 ciclo
94 °C	30 seg	23 ciclos
56 °C	1 min	
72 °C	5 min	1 ciclo

El producto resultante de la pre-amplificación se diluyó 1:50 y se usó como molde de la amplificación selectiva usando cebadores con dos nucleótidos adicionales (cebadores +3). La amplificación selectiva se realizó en un volumen final de 20 μ L. La mezcla de reacción que se usó se describe en la **Tabla 12**

Amplificación Selectiva	
Buffer PCR 10x	2 μ L
H ₂ O miliQ estéril	10,3 μ L
dNTPs (5 mM)	0,8 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μ L
Cebador +3 Eco RI (10 ng/ μ L)	0,5 μ L
Cebador +3 Tru 1I (50 ng/ μ L)	0,6 μ L
Taq Biotools (5 u/ μ L)	0,2 μ L
ADN (Dil 1:50 Pre-Amp)	5 μ L

Tabla 12. Volúmenes de los reactivos usados en la reacción de amplificación selectiva.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador iCycler (Biorad Laboratories) siguiendo el siguiente programa:

94 °C	30 seg	1 ciclo
94 °C	30 seg	1 ciclo
65 °C		1 ciclo
72 °C	1 min	
94 °C		
65 °C – 56 °C (-0,7 °C/ciclo)	30 seg	14 ciclos
72 °C	1 min	
94 °C		
56 °C	30 seg	23 ciclos
72 °C	1 min	
72 °C	6 min	1 ciclo

2.4 Amplificación de marcadores microsatélites (SSRs).

La amplificación de los marcadores SSRs se realizó en un volumen final de 15 μL usando un termociclador iCycler (Biorad Laboratories) o PTC-200 DNA Engine Cycler (MJ Research). La concentración de los distintos reactivos que conforman la mezcla se detallada en la **Tabla 13**.

Microsatélites	
Buffer 10x (20mM Mg ⁺⁺)	1,5 μL
H ₂ O miliQ estéril	9,5 μL
dNTPs (5 mM)	0,6 μL
Primer Reverse	0,6 μL
Primer Forward	0,6 μL
AmpliTaq 1/20	0,2 μL
ADN Muestra	2 μL

Tabla 13. Volúmenes de los reactivos usados en las reacciones de amplificación de microsatélites.

Las parejas de cebadores específicos de los microsatélites usados se detallan en el apéndice 4 **Tabla S8**, donde se incluye la temperatura de anillamiento (*'annealing'*, TA) usada para la amplificación de cada marcador SSR. El programa de PCR típicamente usado se detalla en la tabla siguiente.

95 °C	3 min	1 ciclo
94 °C		
TA °C	30 seg	35 ciclos
72 °C	45 seg	
72 °C	3 min	1 ciclo

2.5 Separación y visualización de los marcadores AFLPs y microsatélites.

Para la separación de los marcadores AFLPs y los microsatélites usados en los experimentos, el producto final resultante de la amplificación selectiva (20 μ L) o de cada marcador microsatélite (15 μ L) fueron mezclados con 13 y 10 μ L respectivamente de tampón de carga con formamida (98% formamida, 10 mM EDTA y 0.1 % Xylene cyanol). A continuación se desnaturalizaron a 95 °C durante cinco min e inmediatamente fueron enfriados en hielo. Un total de 4 μ L de cada muestra fueron separadas mediante electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida al 4,5% (acrilamida/bis acrilamida al 40%; ratio 19:1) en condiciones desnaturalizantes (7M de Urea y tampón TBE al 1%), durante 1 a 3 horas y una potencia de 95 vatios. Los fragmentos se visualizaron mediante tinción con plata, según el protocolo de Benbouza *et al.* (2006). Brevemente, el gel se incubó en agitación durante 7 min en la solución de fijación previamente enfriada a 4°C (10% etanol, 0.5% ácido acético), y durante 10-20 min en la solución de tinción en nitrato de plata al 0.15%. A continuación se lavó brevemente en agua miliQ durante unos 10 segundos y se reveló en NaOH al 1.5% hasta la aparición de las bandas a los 3-6 min. La reacción se detiene al añadir la solución fijadora usada en el primer paso e incubar el gel durante 2-3 min. El gel se enjuagó de nuevo en la bandeja con agua miliQ para eliminar la plata unida inespecíficamente. Los geles se escanearon usando un densitómetro digital GS-800 (Bio-Rad) y el programa Quantity One (Bio-Rad). El tamaño de los amplicones se determinó comparándolos con un marcador de ADN de 10 bp (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

2.6 Programa de cartografiado.

Para realizar el análisis de ligamiento entre los marcadores moleculares y el carácter “estolonado” se usó el programa *Joinmap 4.0* (van Ooijen, 2006) con un LOD mínimo de 3,0 y una frecuencia de recombinantes máxima de 0,4. Las distancias entre marcadores se calcularon usando la función de Kosambi (Kosambi, 1943) y fueron expresadas en centi-Morgan (cM).

2.7 Marcadores DArTseq.

Para la identificación de marcadores SNPs ligados al carácter de estolonado, se genotiparon dos grupos de plantas (pools) usando la plataforma DArTseq (<http://www.diversityarrays.com>). Esta plataforma DArTseq fue previamente optimizada por nuestro grupo para su aplicación en fresa seleccionando el método de reducción de la complejidad genómica más apropiado a la especie (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015). Esté consistió en el uso de las enzimas de restricción Pst I y Mse I. El genotipado de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones de Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Bruce, Australia), siguiendo el protocolo optimizado para fresa propiedad de la empresa DArT. Brevemente,

tras las digestiones, se unen adaptadores al ADN compatibles con los sitios de restricción. Estos adaptadores incluyen secuencias de identificación de las muestras y de anclaje en la plataforma de secuenciación masiva Illumina. Tras una amplificación mediante PCR, las muestras fueron secuenciadas en un aparato GALx de Illumina. El software DArT-soft v.14 fue usado para la identificación de los marcadores SNPs y su puntuación.

2.8 Análisis de la expresión mediante RNA-seq

Se aislaron las coronas de cada planta (ver Material y Métodos del capítulo 2, apartado 2.1.2) el día 14/08/2013, cuando las condiciones de fotoperiodo son adecuadas para el estolonado y la mayoría de las plantas de fresa están estolonando. Se conformaron dos grupos diferenciados, uno compuesto por diez plantas estolonantes (RR²⁰¹³) y otro compuesto por las siete plantas que no consiguieron estolonar a lo largo de todo el experimento (NR²⁰¹³). Cada grupo se subdividió en tres réplicas biológicas independientes, con coronas provenientes de al menos tres plantas distintas, en el caso de RR²⁰¹³ y con coronas provenientes de al menos dos plantas para NR²⁰¹³. Las seis réplicas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. La maceración de cada réplica se realizó en mortero, usando en todo momento nitrógeno líquido para evitar la descongelación del material.

Una vez obtenido el ARN total (ver Material y Métodos del capítulo 2, apartado 2.2) de cada réplica biológica por separado, se procedió a realizar un tratamiento con DNasa I específico, para eliminar el ADN genómico contenido en cada muestra, para que no interfiera con la secuenciación posterior. Partiendo de 10 μg de ARN por muestra se le añadió la enzima DNasa I (Thermo Scientific) a la concentración final recomendada por el fabricante. Cada muestra se incubó durante 20 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se le añadieron 300 μL de agua estéril y 400 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló con vortex. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Se añadió a cada muestra 40 μL de acetato sódico (3 M y pH 5,2) y 1 mL de etanol absoluto. Se incubó la mezcla durante una hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 200 μL de etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el *pellet* y se resuspendió en 20 μL de agua estéril.

La integridad de las muestras se verificó usando el Bioanalizador 2100 de Agilent Technologies mediante el parámetro RIN (RNA Integrity number), obteniendo un rango entre 8,7 y 9,4 para todas las muestras.

La secuenciación y preparación de las librerías se realizó en el Beijing Genome Institute (BGI; Hong Kong) mediante la plataforma Illumina HiSeq 2000, se realizaron dos

lecturas mediante extremos pareados (pair ends) por cada 100 pb, obteniendo entre 22,6 y 21,5 millones de lecturas pareadas para cada muestra, con una media de 22,33 millones de lecturas.

Los datos sin procesar de RNA-seq se introdujeron en el programa CLC Genomics Workbench 7.0. Lo primero que se realizó fue una limpieza de las secuencias para eliminar los adaptadores y las lecturas de mala calidad, con un límite de calidad (evaluado por el programa como quality score) de 0,02. Antes y después de su limpieza se realizó un control de calidad de las lecturas mediante el programa FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Todas las réplicas del experimento presentaron parámetros de calidad adecuados para su uso. Las lecturas del RNA-seq fueron cartografiadas (mapeadas) sobre el genoma de referencia de *F. vesca* v1.0 obtenido de la base de datos de *Rosaceae* (GDR; <http://www.rosaceae.org>; Shulaev *et al.*, 2011). El mapeo de las lecturas en el genoma de referencia se llevó a cabo con los parámetros predeterminados en el programa, donde el número de desajustes permitido fue de 2 (*mismatch*), el costo de inserción y deleción de 3, fracción mínima de longitud 0,9 (al menos el 90 % de las bases tienen que alinear con la secuencia de referencia) y número máximo de aciertos (*hits*) para una lectura de 10. Para normalizar el número de las diferentes lecturas mapeadas entre las muestras, se utilizó la medida de expresión: lecturas por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas (FPKM, *Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008). Cuando se obtuvo el mapeado, se realizó el análisis de expresión diferencial en el CLC Genomics Workbench, donde se estudiaron las diferencias entre los grupos de plantas Estolonantes (RR) frente a las No estolonantes (NR) haciendo uso del análisis estadístico t-test con un valor de probabilidad mínimo de $p \leq 0,001$ (la probabilidad corregida FDR fue ≤ 0.0132). Se estableció un umbral de expresión significativa para los transcritos mayor de 0,5 FPKM. Se consideraron que tenían expresión diferencial aquellos *locus* cuyo valor absoluto del cociente de expresión entre las dos situaciones era mayor de 2.

Junto con el genoma de *F. vesca* se utilizó un fichero de anotaciones desarrollado a partir del modelo de Shulaev (Shulaev *et al.*, 2011), mediante el cual se podían asociar determinados transcritos con los genes de *F. vesca* sobre los que mapeaban y cuantificar su expresión. Para realizar un análisis funcional de los genes7transcritos expresados se utilizó el programa MapMan (<http://mapman.gabipd.org>, Thimm *et al.*, 2004). Mapman permite mostrar los datos de expresión mediante diagramas y esquematizaciones de diferentes rutas metabólicas. Las diferencias de expresión de cada gen (expresadas con el logaritmo en base 2 del cociente de expresión de cada gen) son representadas mediante un código de colores. De esta forma, el programa nos permite identificar y visualizar genes que se encuentran inducidos o reprimidos en las diferentes rutas metabólicas. Para la

clasificación funcional de los distintos genes de *F. vesca* se utilizó el “mapping” de Phytozone v-0.9 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) en el que los genes están asignados a grupos funcionales y anotados con términos PFAN, KEGG o GO, en función de su agrupación en clados de genes ortólogos/parálogos.

2.9 Filtrado de datos y cruzado de marcadores polimórficos con RNA-seq.

Los marcadores SNPs polimórficos derivados de la plataforma DArTseq obtenidos a partir del análisis realizado sobre los grupos RR²⁰¹² y NR²⁰¹² se ubicaron en un entorno de 10.000 pb (10 Kb) anterior y posterior a la secuencia de los *loci* con expresión diferencial obtenidos a partir del análisis por RNA-seq (ver Material y Métodos 3.2.8). Para ello se utilizó el programa Bowtie v2.1 con condiciones estándar (Langmead y Salzberg, 2012).

3. Resultados.

3.1 Análisis de la segregación del estolonado e identificación de marcadores AFLPs ligados a este carácter en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’.

En la fresa diploide *F. vesca*, el alelo dominante del gen *SFL* que controla la floración estacional se hereda independientemente del alelo dominante en el *locus R*, que confiere la capacidad de estolonado (Brown and Wareing 1965; Albani *et al.*, 2004;). El *locus R* ha sido mapeado en el grupo de ligamiento II de *F. vesca* (Davis y Yu, 1997; Sargent *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Iwata *et al.*, 2012). Estudios recientes en la especie cultivada, *F. × ananassa*, han mostrado un control genético de ambos caracteres diferente (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015; Perrote *et al.*, 2015). Estos estudios coinciden en la identificación de un QTL mayoritario nombrado como *FaPFRU* en el grupo de homoeología IV que afecta de manera inversa la floración neutra y el estolonado. Este resultado concuerda con el hecho de que las variedades de fresa de día neutro se asocian frecuentemente con un número menor de estolones y son por tanto más complicadas de multiplicar vegetativamente en viveros (Hancock *et al.*, 2002). Sin embargo, otros QTL de menor importancia han sido identificados en estos estudios (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015). Por lo tanto, más estudios son necesarios para profundizar en nuestro conocimiento del control genético del estolonado en la fresa cultivada.

Para identificar la posición del *locus R* en la fresa cultivada, se analizó una población F_2 segregante, obtenida por cruzamiento de las variedades de día corto ‘Endurance’ y ‘Parker’ y posterior auto-fecundación del individuo F_1 PS6-2. La población F_2 estaba constituida por 144 individuos inicialmente, pero se redujo su número hasta 137 (tras los dos primeros años de estudio; 2008 y 2009) por muerte de varios individuos. Tanto ‘Parker’ como ‘Endurance’ son variedades de SD, con lo que el carácter de día neutro no está segregando en esta población. Esto supone una ventaja a la hora de estudiar el estolonado ya que permitiría la identificación de otros *loci* que pudieran estar implicados en el carácter del estolonado independientes del *locus FaPFRU* que afecta al tipo de floración de esta especie.

Estudios previos de caracterización de esta población mostraron que aunque ambos parentales eran capaces de estolonar, un número de individuos F_2 no estolonaban. Al analizar en detalle la capacidad de estolonado de la población F_2 se observó que aproximadamente un cuarto de la progenie no estolonaba, mientras que el resto (75%) si estolonaba; repitiéndose los resultados durante las dos campañas de estudio (2008 y 2009). Para ver si los datos se ajustaban a la segregación esperada para un gen dominante, se realizó un test de Chi-Cuadrado. Las frecuencias de cada campaña se ajustaban a una

segregación 3:1 pudiendo estar el carácter fenotípico del estolonado controlado por un solo gen en especies octoploides, donde el carácter estolonado sería dominante frente al no estolonado, como ocurre en *F. vesca* (Brown y Wareing, 1965; Cordero-Alba, 2010).

Los individuos que no estolonaban variaron ligeramente de un año al siguiente, y de un total de 137 plantas, únicamente 20 de ellas no estolonaron en ninguno de los dos años. Estos 20 individuos se dividieron en dos grupos, de diez individuos cada uno, de plantas no estolonantes (NR1 y NR2). Entre los individuos de la población se seleccionaron 20 individuos que estolonaron normalmente y con ellos se crearon otros dos grupos de diez individuos (RR1 y RR2), con capacidad para estolonar. Estos cuatro grupos se usaron para la búsqueda de marcadores AFLPs ligados al carácter fenotípico estolonado (Cordero-Alba, 2010).

Los cuatro grupos se usaron para un análisis por Bulk Segregant Analysis (BSA), en el que cada grupo (NR1, NR2, RR1 y RR2) contenía la misma cantidad de ADN de diez individuos F_2 diferentes. Se usaron 224 combinaciones de cebadores AFLPs (16 *EcoRI*+2/+3 con 14 *Tru1I*+3) para la búsqueda de polimorfismo entre los grupos. Cada combinación de cebadores usados produjo una media de 102 bandas en los geles de AFLPs. Teniendo en cuenta el número de combinaciones usadas, el número medio de bandas polimórficas por combinación que se estimó en 14,5, y un tamaño estimado del mapa genético de *F. × ananassa* en 2500 cM (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008), al final del escrutinio la cobertura del análisis fue de aprox. un marcador cada 0,8 cM. Finalmente, de las 224 combinaciones de cebadores de AFLPs usadas, únicamente dos parejas: E25M30 y E26M31, dieron posibles bandas asociadas al carácter del estolonado (Cordero-Alba, 2010). Los fenotipos observados en los individuos variaron ligeramente de un año para otro. Esto posiblemente sea debido a la presencia de otros *loci* con efectos minoritarios sobre el carácter estudiado, tratándose en realidad de un carácter cuantitativo (QTL). Además, a esto hay que sumar el efecto del ambiente y el estado nutricional de la planta, en cada momento, ambos con un gran efecto sobre la fenología de la fresa cultivada y en particular sobre este carácter (Hytönen y Elomaa, 2011).

3.2 Análisis genético del estolonado en 'Endurance' y 'Parker'

Los dos parentales de la población segregante, 'Endurance' y 'Parker', estolonan con normalidad. Con el objetivo de identificar el origen del defecto en el estolonado de la población F_2 , procedimos a realizar un análisis genético a los parentales. Ya que la capacidad de estolonado está segregando en la población, el individuo F_1 PS6-2 debe ser heterocigoto para el *locus R*. Para identificar el genotipo de los cultivares 'Endurance' y 'Parker', se auto-fecundaron plantas de ambos cultivares protegiendo las plantas de insectos mediante jaulas de malla. Como control se volvió a auto-fecundar el híbrido F_1

PS6-2. Se germinaron las semillas de cada auto-fecundación y se crecieron 50 plantas de cada una. Tras cinco años de cultivo en macetas en el umbráculo se evaluó el número de plantas incapaces de estolonar (**Tabla 14**). Las 50 plantas procedentes del cultivar ‘Parker’ estolonaron en el primer y/o segundo año de análisis, mientras que 12 plantas (24%) de la auto-fecundación de ‘Endurance’ no estolonaron en los 5 años de análisis. Tal como se había observado en la población segregante de muestreo (‘Endurance’ × ‘Parker’), la auto-fecundación del individuo F₁ PS6-2 también segregó para el carácter de estolonado. Un total de 9 plantas (18%) de las cincuenta crecidas no estolonaron en los 5 años que duraron los experimentos de cruzamiento (**Tabla 14**).

Cruzamiento	n	Observado		Esperado		χ^2 p-value
		R-	rr	R-	rr	
Endurance × Endurance	50	38	12	37,5	12,5	0,8702827
Parker × Parker	50	50	0	37,5	12,5	4,455E-05
F₁ PS6-2 × F₁ PS6-2	50	41	9	37,5	12,5	0,2529991

Tabla 14. Tabla de ajuste del carácter estolonado a una segregación esperada 3:1. Test estadístico usado Chi-cuadrado. Destacados en negrita los datos que se ajustaron a una segregación 3:1. n representa el número de plantas de cada cruzamiento al inicio del experimento (2010).

Los resultados observados indican que el defecto en el estolonado procede del cultivar ‘Endurance’, el cual al ser capaz de estolonar debe tener un genotipo heterocigótico (‘Rr’). La planta F₁ elegida en 2008 para generar la población de muestreo ‘Endurance’ × ‘Parker’ (PS6-2) también tendría un genotipo ‘Rr’ que segrega 3:1 en la F₂ de 50 líneas hijas y en la población mayor analizada en esta tesis. Por el contrario, el cultivar ‘Parker’ deber ser ‘RR’ ya que todos los individuos F₂, provenientes de su auto-fecundación, fueron estolonantes.

3.3 Genotipado de la población segregante ‘Endurance’ × ‘Parker’ con los marcadores AFLPs polimórficos

Las dos combinaciones de cebadores con bandas polimórficas asociadas al estolonado en los trabajos previos y analizadas únicamente en los individuos integrantes de los grupos NR y RR, fueron usadas para genotipar la población completa. Para la pareja de cebadores E25M30 se observó que el número de individuos recombinantes presentes en la población era elevado. Además, con esta combinación, la banda polimórfica es de un tamaño superior a 1100 bp, de difícil reproducción y que amplificaba con dificultad, dando lugar a geles de difícil puntuación, por el bandeo tenue y difuso. Esta combinación y por tanto este marcador AFLP, fue descartado para la construcción del mapa flanqueante al locus R.

La combinación de cebadores E26M31 daba lugar a una banda 580 bp de tamaño que estaba asociada al estolonado en los estudios previos. Al genotipar la población F₂ y realizar el test de Chi-cuadrado a las frecuencias obtenidas tras la puntuación de los geles, se observó que la segregación de este marcador AFLP, se ajustaba a una segregación 3:1 (p-value 0,0662). Un ejemplo de la puntuación de los geles para la combinación E26M31 se muestra en la **Figura 48**.

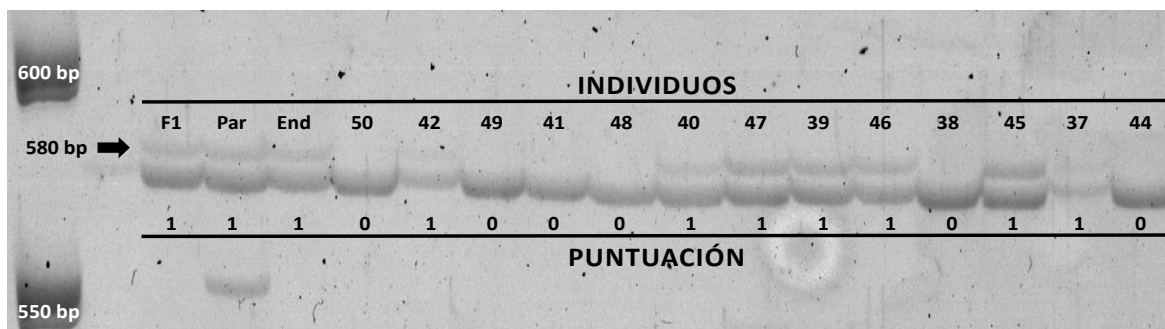


Figura 48. Detalle del gel de AFLPs obtenido con la combinación E26M31, en la que se muestran los parentales (Par: 'Parker', End: 'Endurance'), el individuo F1 y algunos de los individuos segregantes que conforman la población y la puntuación del gel usada para generar el mapa genético del *locus* (0 ausencia del marcador; 1 presencia). El marcador polimórfico ligado al estolonado se indica con una flecha negra (580 bp).

3.4 Mapa de ligamiento del *locus* R.

Para estimar la distancia entre el marcador AFLPs E26M31-580 y el *locus* R se usaron los datos de genotipado del marcador, las medidas fenotípicas de la capacidad de estolonado de la población durante tres campañas (2008, 2009 y 2010) y el programa de cartografiado Joinmap 4.0 (van Ooijen, 2006). La capacidad de estolonado se estimó de manera cualitativa, 0 si el individuo F2 no estolonó y 1 si estolonó cada año. Dada la variabilidad de los datos de estolonado durante las tres campañas que duró el estudio, se contemplaron varias posibilidades a la hora de realizar el mapa. La primera de ellas consistió en usar los datos de cada campaña (2008, 2009 y 2010) por separado. Posteriormente, se agruparon los datos de estolonado de dos campañas, asumiendo que un individuo era *rr* (homocigota recesiva = 0) cuando no estolonó en ninguno de los dos años y *RR* o *Rr* (*R* = 1) si fue capaz de estolonar al menos uno de los dos años. Por último, se agruparon los datos de las tres campañas, de dos maneras diferentes. La primera de ellas consistió en tener en cuenta como no estolonante, solo aquellos individuos incapaces de estolonar durante los tres años en estudio ("En los 3" en **Tabla 15**). La última opción, "Mayoría 3", contempla como estolonantes (*R*-) y no estolonantes (*rr*), aquellos individuos que estolonaron o no estolonaron en al menos dos campañas respectivamente. En total, se contemplaron 8 posibilidades, resumidas en la **Tabla 15**.

Campaña	n	Observado		Esperado		χ^2 p-value
		R-	rr	R-	rr	
2008	140	102	38	105	35	0,5582
2009	140	102	42	105	35	0,1719
2010	132	96	36	99	33	0,5465
2008 / 2009	140	120	20	105	35	0,0034
2008 / 2010	134	112	22	100,5	33,5	0,0218
2009 / 2010	134	111	23	100,5	33,5	0,0362
“En los 3”	134	117	17	105,5	33,5	0,0010
“Mayoría 3”	133	102	31	99,75	33,25	0,6523

Tabla 15. Tabla de ajuste del carácter estolonado a una segregación esperada 3:1. Test estadístico usado Chi-cuadrado. Destacados en negrita los datos que se ajustaron a una segregación 3:1. n representa el número de individuos F2 de la población evaluados en cada caso.

De las 8 posibilidades distintas en que se usaron los datos de estolonado, el marcador AFLP E26M31-580 apareció ligado al carácter de estolonado en cinco ocasiones. De estas cinco ocasiones únicamente en dos se obtuvo un mapa con un LOD superior a 3,0. Estos dos casos fueron cuando se utilizaron los datos de estolonado del año 2009 y los datos conjuntos de 2009/2010. En el mapa de ligamiento, generado a partir de los datos de estolonado de la campaña 2009, el marcador E26M31-580 apareció ligado al *locus R* a una distancia de 25,9 cM, con un LOD de 5,63 (**Figura 49A**). Cuando se usaron los datos de estolonado conjuntos de las campañas 2009/2010, la distancia del marcador E26M31-580 al carácter fenotípico en esta ocasión fue de 35,6 cM y con un LOD de 3,29 (**Figura 49B**).

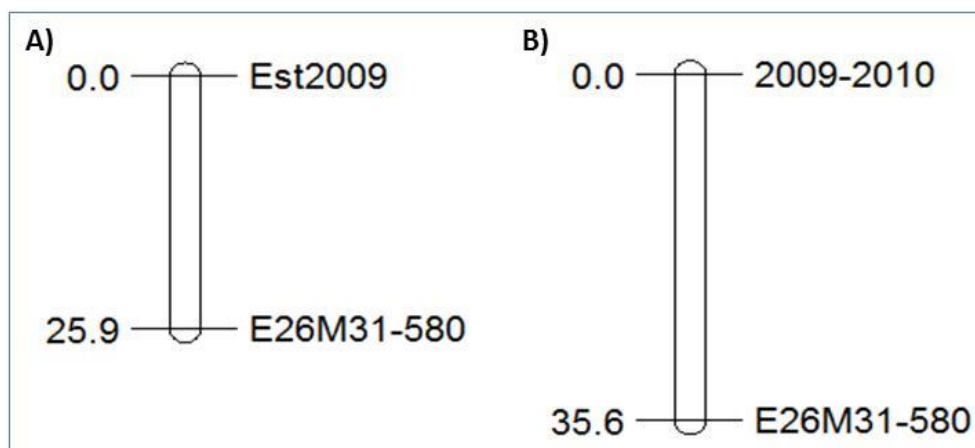


Figura 49. Mapas de ligamiento de la región adyacente al locus R. (A) usando los datos del año 2009 y (B) los datos conjuntos de las campañas 2009/2010. Los nombres de los *loci* aparecen a la derecha de los grupos de ligamiento y las distancias (en cM) a la izquierda.

Además usando los datos de estolonado de: 2008/2009, “Mayoría 3” y “En los 3” también se detectó ligamiento aunque a LOD por debajo de 3,0. Estos mapas son poco fiables pero refuerzan los resultados anteriores:

- 2008/2009 LOD 2,7 (40,7 cM).
- “Mayoría 3” LOD 2,5 (37,8 cM).
- “En los 3” LOD 2,3 (44,2 cM).

3.5 Análisis de grupos segregantes (BSA) usando marcadores Microsatélites (SSR)

Los estudios previos de BSA usando marcadores AFLPs han resultado en la identificación de solo un marcador a una distancia considerable del carácter del estolonado. Con el objetivo de identificar marcadores SSR más cercanos al *locus R* que el marcador AFLPs E26M31-580 (**Figura 49**) y poder identificar el grupo de ligamiento (LG) en el que se localiza el carácter estolonado, la población 'Endurance' × 'Parker' fue barrida con una amplia batería de marcadores microsatélites, distribuidos por todos los grupos de homoeología de la fresa octoploide (apéndice 4 **Tabla S8**). La estrategia seguida en este experimento fue la misma que en el barrido efectuado para la identificación de marcadores AFLP: Bulk segregant analysis (BSA). Sin embargo, modificamos los grupos usados para el análisis por BSA basándonos en los datos adicionales obtenidos durante la campaña 2012. A lo largo de la campaña 2012, se realizó una medida cuantitativa del número de estolones producido por cada individuo (apéndice 3 **Tabla S7**). Al finalizar la toma de datos, la segregación del estolonado en esta campaña seguía ajustándose a una segregación 3:1 (Chi-cuadrado p -value = 0,4142). Del análisis de los datos conjuntos, se identificaron doce plantas incapaces de estolonar en las cuatro campañas evaluadas (2008, 2009, 2010 y 2012). Basándonos en los nuevos datos cuantitativos recabados modificamos la composición de los grupos utilizados para la búsqueda de marcadores AFLPs. Los individuos que componen los grupos y el número de estolones producidos en esta campaña se muestran en la tabla siguiente:

Grupo	Individuos									
	F2-3	F2-20	F2-56	F2-82	F2-106	F2-109	F2-128	F2-129	F2-134	F2-141
RR ²⁰¹²	(44)	(72)	(34)	(48)	(37)	(33)	(34)	(54)	(24)	(27)
NR ²⁰¹²	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla 16. Conformación de los grupos de plantas Estolonantes (RR²⁰¹²) y No estolonantes (NR²⁰¹²). Fila superior número de identificación de la planta. Entre paréntesis número de estolones producido por cada planta durante la campaña 2012.

En total se analizaron 140 marcadores SSR (apéndice 4 **Tabla S8**) distribuidos por todos los grupos de homoeología de *F. × ananassa* (**Tabla 17**). A pesar de la amplia batería de marcadores usados en este segundo barrido, no se identificó ninguna banda polimórfica entre los grupos de plantas estolonantes (RR²⁰¹²) y no estolonantes (NR²⁰¹²) (**Figura 50**).

Grupo de Homeología	Número de SSRs
GL I	16
GL II	24
GL III	18
GL IV	28
GL V	17
GL VI	25
GL VII	13
NP	23
Total	140

Tabla 17. Tabla resumen de los marcadores SSR analizados en la población segregante ‘Endurance’ x ‘Parker’ y los GL en los que se localizan.

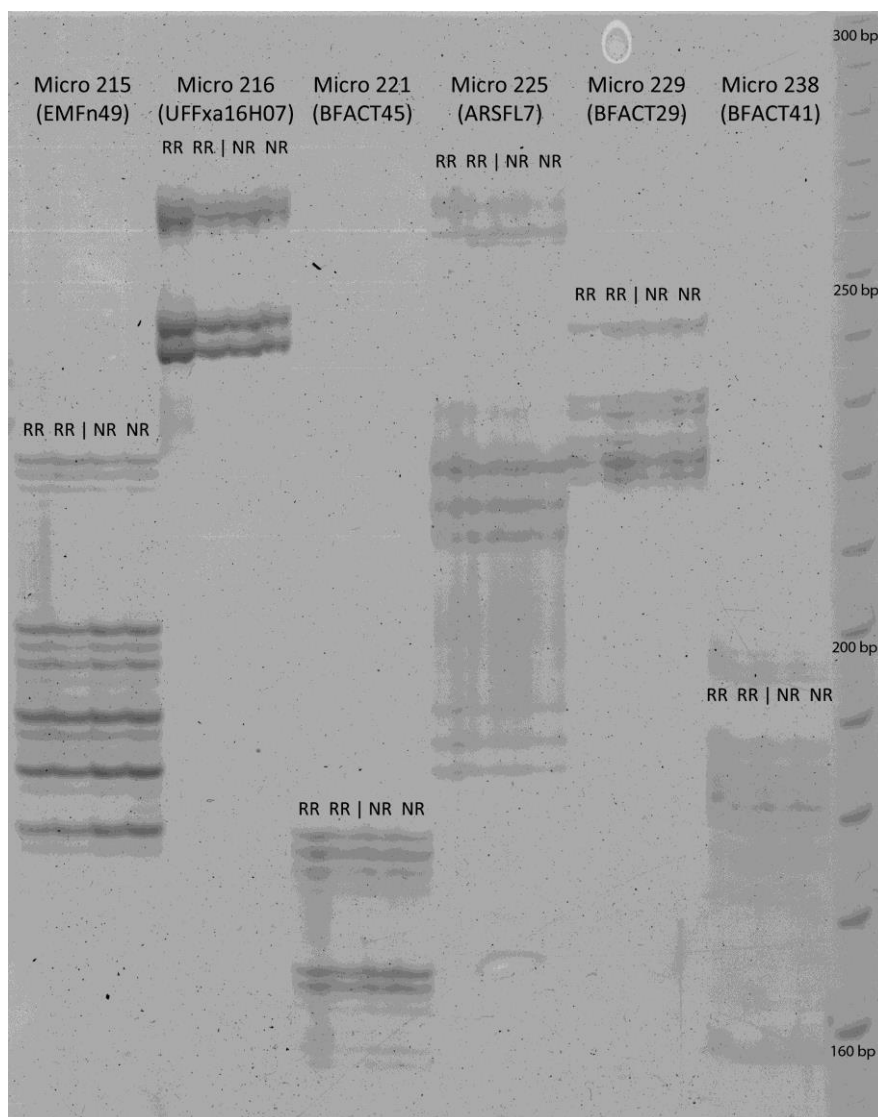


Figura 50. Detalle de gel de acrilamida en el que se observan seis microsatélites. Las calles corresponden a los grupos RR²⁰¹² (estolonantes) y NR²⁰¹² (no estolonantes), se representan dos réplicas (PCR independientes) de ambos grupos por microsatélite.

3.6 Identificación de genes diferencialmente expresados mediante RNA-seq.

Con los datos cuantitativos obtenidos tras contabilizar el número de estolones producidos por cada planta durante la campaña de 2013 (apéndice 3 **Tabla S7**) se diseñaron dos grupos de plantas. El primero se formó con las diez plantas que produjeron un mayor número de estolones durante esta campaña y se nombró como RR²⁰¹³ (“Estolonantes”). El otro grupo se formó con las siete plantas que no estolonaron durante ninguna campaña hasta el 2013, y se le denominó NR²⁰¹³ (“No estolonantes”) (**Tabla 18**). Se analizaron tres réplicas biológicas independientes de cada grupo (ver Material y Métodos del capítulo 3, apartado 2.8)

Grupo	Individuos									
RR ²⁰¹³	F2-8 (21)	F2-20 (16)	F2-56 (22)	F2-80 (28)	F2-82 (26)	F2-89 (15)	F2-98 (15)	F2-106 (19)	F2-124 (17)	F2-141 (24)
NR ²⁰¹³	F2-5 (-)	F2-44 (-)	F2-60 (-)	F2-61 (-)	F2-73 (-)	F2-83 (-)	F2-121 (-)			

Tabla 18. Conformación de los grupos de plantas Estolonantes (RR²⁰¹³) y No estolonantes (NR²⁰¹³). Fila superior número de identificación de la planta. Entre paréntesis número de estolones producido por cada planta durante la campaña 2013.

En la **Tabla 19** se muestran un resumen de los resultados brutos obtenidos a partir del análisis de RNA-seq realizado sobre ambos grupos de plantas, estolonantes (RR²⁰¹³) y no estolonantes (NR²⁰¹³). Se obtuvieron aproximadamente entre 42,97 (21,5) y 45,20 (22,60) millones de lecturas (pareadas) por cada réplica, de las cuales aproximadamente el 83% mapearon sobre el genoma de *Fragaria vesca-v1.0*. Una vez realizado el mapeo con el programa CLC Genomics Workbench 7.0. Se identificaron 40 014 transcritos, entre los que se localizaron 31 759 genes.

Muestra/Réplica	Total de lecturas	Lecturas Pareadas	Mapeadas	(%)
RR ²⁰¹³ / 1	45,20 M	22,60 M	37,68 M	83,3
RR ²⁰¹³ / 2	45,20 M	22,60 M	37,64 M	83,3
RR ²⁰¹³ / 3	44,36 M	22,18 M	36,98 M	83,3
NR ²⁰¹³ / 1	42,97 M	21,50 M	35,84 M	83,4
NR ²⁰¹³ / 2	45,18 M	22,59 M	37,66 M	83,3
NR ²⁰¹³ / 3	45,11 M	22,55 M	37,56 M	83,3

Tabla 19. Resumen de las lecturas de tres réplicas biológicas realizadas sobre los grupos de plantas estolonantes (RR²⁰¹³) y no estolonantes (NR²⁰¹³). M, millones de lecturas. (%) Porcentaje de lecturas mapeadas sobre el genoma de referencia, *Fragaria vesca-v1.0*.

El análisis de la expresión diferencial entre los grupos de plantas estolonantes (RR²⁰¹³) y no estolonantes (NR²⁰¹³) se calculó usando el ratio de valores FPKM de cada gen entre los grupos. Un total de 2 350 genes mostraron diferencias significativas de expresión ($p \leq 0,001$) entre ambos grupos (RR²⁰¹³ y NR²⁰¹³). De estos 2 350 genes, 710 presentaron diferencias en sus niveles de expresión (cuantificado en FPKM) mayores o iguales del doble.

Centraremos el estudio en estos 710 genes, con diferencias de expresión más acusadas. Los genes con una expresión diferencial mayor se distribuyeron de una manera uniforme entre los siete grupos ligamiento de *F. vesca* (**Figura 51A**). De estos, 389 (55%) aparecen sobre-expresados en el grupo de plantas estolonantes (RR²⁰¹³) mientras que 321 (45%) presentaron una expresión mayor en las plantas no estolonantes (NR²⁰¹³) (**Figura 51B**). Entre ambos grupos, no se encontraron diferencias tipo presencia-ausencia (*swich-on/off*), es decir, no encontramos ningún gen con expresión específica en uno u otro grupo.

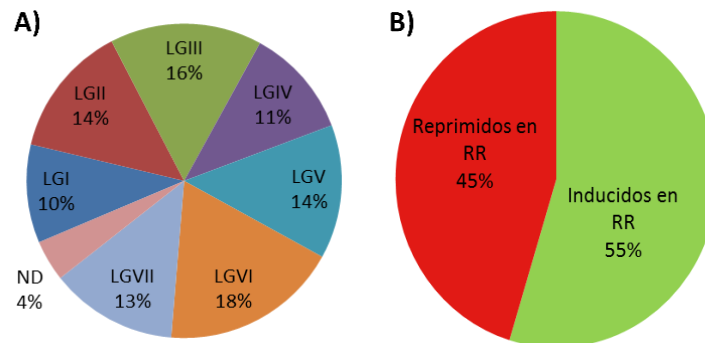


Figura 51. (A) Distribución de los 710 genes con diferencias de expresión mayores de 2 entre los distintos grupos de homeología de *F. x ananassa*. **(B) Porcentaje de genes del grupo "Estolonantes" (RR) inducidos y reprimidos.**

En la **tabla 20** observamos los 20 genes inducidos en las plantas estolonantes con mayores diferencias de expresión. Esta tabla incluye genes con niveles de expresión altos y que por tanto generan diferencias de expresión mayores entre los dos grupos. Entre este grupo de genes, las tasas de cambio (fold change, en la tabla) oscilaron entre 6,4 y 2,0 veces más expresión. Al ordenar los 389 genes inducidos en el grupo RR²⁰¹³ mediante la tasa de cambio (**Tabla 21**), 17 genes de los 20 primeros presentaron una tasa de cambio entre los dos grupos superior a diez, encontrándonos en los casos más extremos genes con 20, 25 o 50 veces más expresión en las plantas estolonantes. En ambas tablas hemos destacado seis genes en rojo que están relacionados con la síntesis y regulación del etileno y que parecen tener relación con el estolonado, como detallaremos más adelante.

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
1	gene22974 s-adenosylmethionine synthetase	2808,10	1402,57	1405,53	2,00	0,005229
2	gene140 #N/A	1259,95	399,60	860,35	3,15	0,003937
3	gene21260 21 kda	1331,69	521,20	810,49	2,56	0,006812
4	gene27141 ---NA---	1047,44	348,38	699,06	3,01	0,003585
5	gene07065 mal d	842,06	159,46	682,60	5,28	0,002755
6	gene34207 cytosolic sulfotransferase 15-like	701,70	109,65	592,05	6,40	0,003909
7	gene05185 major allergen mal d	731,02	140,35	590,67	5,21	0,011216
8	gene15533 acetyl- c-acetyltransferase	801,18	294,81	506,37	2,72	0,002755
9	gene16810 isopentenyl diphosphate isomerase	697,39	309,38	388,01	2,25	0,006328
10	gene13533 udp-glycosyltransferase 73c5-like	602,76	257,72	345,04	2,34	0,005259
11	gene07063 mal d	389,85	66,35	323,50	5,88	0,004041
12	gene24713 calcium-dependent lipid-binding family protein	512,01	194,69	317,32	2,63	0,006328
13	gene30433 polyphenol oxidase	542,55	238,00	304,55	2,28	0,003937
14	gene12563 inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 1-like	347,73	90,04	257,69	3,86	0,001773
15	gene10776 protein srg1-like	379,62	128,45	251,17	2,96	0,003937
16	gene25414 uncharacterized protein LOC101309518	403,09	167,64	235,45	2,40	0,007775
17	gene30398 uncharacterized membrane	442,80	207,47	235,33	2,13	0,005253
18	gene19848 farnesyl diphosphate synthase	326,26	100,79	225,47	3,24	0,004934
19	gene22562 uncharacterized loc101212067	366,67	152,34	214,34	2,41	0,002154
20	gene05424 zinc finger	401,21	189,71	211,49	2,11	0,006731

Tabla 20. Listados de los 20 genes con diferencias de expresión mayores entre los grupos de plantas estolonantes y no estolonantes. En negrita los cinco genes con mayores tasas de cambio. En rojo genes relacionados con el etileno. RR y NR representan la media de expresión (en FPKM) de tres réplicas biológicas independientes.

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
1	gene21257 cyclin-dependent kinase f-4-like	28,24	0,56	27,68	50,83	0,000829
2	gene21256 21 kda	118,58	4,59	113,99	25,83	0,000757
3	gene18872 (-)-germacrene d synthase-like	15,88	0,79	15,09	20,15	0,000021
4	gene08235 ---NA---	0,60	0,03	0,57	20,02	0,000198
5	gene11448 uncharacterized protein LOC101298879	190,74	9,75	180,99	19,56	0,000011
6	gene27604 ap2 erf domain-containing transcription factor	136,58	7,42	129,16	18,41	0,000006
7	gene12725 dna repair protein reca-like protein	1,16	0,06	1,10	18,38	0,000418
8	gene08065 hyoscyamine 6-dioxygenase-like	2,14	0,12	2,02	18,28	0,000018
9	gene26152 protein	1,34	0,09	1,25	14,58	0,000217
10	gene23219 protein	25,24	1,79	23,46	14,12	0,000159
11	gene18038 probable carboxylesterase 15-like	11,42	0,81	10,61	14,04	0,000494
12	gene09119 subtilisin-like protease-like	2,32	0,17	2,15	13,90	0,000021
13	gene18341 leucoanthocyanidin dioxygenase	197,28	15,30	181,98	12,90	0,000001
14	gene02231 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	9,49	0,82	8,67	11,63	0,000297
15	gene16486 dna-binding storekeeper transcriptional regulator	1,76	0,16	1,60	11,02	0,000029
16	gene05123 major allergen pru ar 1-like	60,91	5,80	55,11	10,51	0,000150
17	gene24079 patatin group a-3-like	3,56	0,34	3,22	10,40	0,000146
18	gene01857 Hyoscyamine 6-dioxygenase-like	42,40	4,16	38,25	10,20	0,000158
19	gene08914 aquaporin tip2-3	1,74	0,19	1,56	9,43	0,000215
20	gene07083 major allergen pru ar 1-like	13,35	1,42	11,93	9,38	0,000232

Tabla 21. Listado de los top 20 genes inducidos en el grupo de plantas estolonantes, ordenados según su tasa de cambio. RR y NR representan la media de expresión (en FPKM) de tres réplicas biológicas independientes. En rojo genes relacionados con el etileno.

Cuando analizamos los genes inducidos en las plantas no estolonantes, observamos que tanto las diferencias de expresión como las tasas de cambio fueron menores entre los grupos (apéndice 7, **Tabla S11**). Los genes con las diferencias de expresión más acentuadas presentan unas tasas de cambio comprendidas entre 2 y 3 (**Tabla 22**), mientras que las tasas de cambio más altas, en ningún caso son 6 veces superiores, quedándose entre 3,65 y 5,77 veces más expresión en las plantas no estolonantes (**Tabla 23**).

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
1 gene17369	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase	383,56	963,15	-579,59	-2,51	0,000517
2 gene20982	zinc finger ccch domain-containing protein 29-like	507,63	1037,40	-529,76	-2,04	0,000600
3 gene10501	transcription factor myc2-like	428,44	924,78	-496,34	-2,16	0,000227
4 gene32076	probable wrky transcription factor 53-like	357,18	775,87	-418,69	-2,17	0,000896
5 gene19280	dehydration-responsive protein rd22	372,05	775,26	-403,21	-2,08	0,000445
6 gene29769	glutaredoxin-c9-like	298,51	628,99	-330,48	-2,11	0,000459
7 gene17368	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase	152,57	437,11	-284,54	-2,86	0,000009
8 gene13803	probable wrky transcription factor 33-like	162,00	408,90	-246,90	-2,52	0,000216
9 gene01869	uncharacterized loc101209217	165,76	356,25	-190,49	-2,15	0,000096
10 gene00185	r2r3-myb transcription factor	133,52	312,56	-179,04	-2,34	0,000188
11 gene23712	aquaporin pip	137,41	295,24	-157,83	-2,15	0,000613
12 gene17454	lipid-transfer protein dir1-like	86,37	238,60	-152,24	-2,76	0,000039
13 gene29159	bzip transcription factor 60-like	106,35	249,29	-142,94	-2,34	0,000098
14 gene24519	probable protein phosphatase 2c 49-like	100,54	232,26	-131,73	-2,31	0,000156
15 gene27107	probable disease resistance protein at5g66900-like	66,11	184,99	-118,88	-2,80	0,000290
16 gene26366	protein binding	85,31	199,14	-113,84	-2,33	0,000004
17 gene02631	probable xyloglucan glycosyltransferase 12-like	89,34	197,00	-107,65	-2,20	0,000069
18 gene 117	#N/A	81,35	187,23	-105,88	-2,30	0,000149
19 gene12308	wrky transcription factor 11	91,40	196,53	-105,12	-2,15	0,000014
20 gene21365	probable wrky transcription factor 70-like	36,53	121,31	-84,78	-3,32	0,000435

Tabla 22. Listado de los 20 genes inducidos en el grupo de plantas No estolonantes, ordenados por las diferencias de expresión. En negrita los cinco genes con mayores tasas de cambio. RR y NR representan la media de expresión (en RPKM) de tres réplicas biológicas independientes.

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
1 gene00955	ring-h2 finger protein	0,22	1,29	-1,07	-5,77	0,000875
2 gene07999	probable anion transporter chloroplastic-like	0,13	0,63	-0,49	-4,76	0,000816
3 gene25944	protein	0,84	3,91	-3,07	-4,63	0,000080
4 gene28726	---NA---	0,22	1,00	-0,78	-4,59	0,000847
5 gene02111	hypothetical protein PRUPE_ppa020729mg	1,17	5,04	-3,88	-4,32	0,000108
6 gene31371	chlorophyll a-b binding expressed	10,81	46,12	-35,31	-4,27	0,000270
7 gene13380	cytochrome p450 704c1-like	1,65	7,00	-5,36	-4,25	0,000184
8 gene17376	ninja-family protein afp3	2,55	10,59	-8,04	-4,16	0,000686
9 gene26203	pinus taeda anonymous locus 2_3802_02 genomic sequence	1,04	4,31	-3,27	-4,15	0,000074
10 gene23193	chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	6,18	25,41	-19,22	-4,11	0,000316
11 gene18866	vacuolar cation proton exchanger 1-like	3,48	14,16	-10,68	-4,07	0,000101
12 gene01653	probable fructose-bisphosphate aldolase chloroplastic-like	5,81	23,41	-17,60	-4,03	0,000658
13 gene14283	---NA---	0,18	0,71	-0,53	-4,00	0,000060
14 gene29607	pathogenesis-related protein pr-1-like	0,42	1,63	-1,21	-3,87	0,000876
15 gene10956	nad h-quinone oxidoreductase subunit chloroplastic-like	0,83	3,14	-2,32	-3,80	0,000513
16 gene12049	uncharacterized protein LOC101303619	6,08	22,77	-16,68	-3,74	0,000153
17 gene29996	probable serine threonine-protein kinase at1g18390-like	16,59	62,06	-45,47	-3,74	0,000019
18 gene27813	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kda	0,67	2,46	-1,79	-3,68	0,000525
19 gene24271	psi type iii chlorophyll a b-binding protein	13,48	49,55	-36,08	-3,68	0,000399
20 gene31278	protochlorophyllide chloroplastic-like	21,99	80,30	-58,31	-3,65	0,000151

Tabla 23. Listado de los top 20 genes inducidos en el grupo de plantas No estolonantes, ordenados según su tasa de cambio. RR y NR representan la media de expresión (en FPKM) de tres réplicas biológicas independientes.

Debido a la falta de genes con diferencias tipo presencia-ausencia (*switch-on/off*) y al no encontrarse ningún gen (con una diferencia de expresión alta entre ambos grupos y con una función que lo identificara como un gen candidato, procedimos a realizar una caracterización funcional de los 710 genes diferencialmente expresados. Para realizar la caracterización nos ayudamos de la herramienta MapMan (Thimm *et al.*, 2004). Las 23 categorías representadas en la **Figura 52** pueden ser agrupadas en tres grupos. (i) En el primer grupo se engloban las categorías con un mayor número de genes diferencialmente expresados, incluye las categorías: 35 (31%), 27 (14%), 26 (9%), 29 (9%) y 30 (7%). La

categoría 35 (la más numerosa, 218 genes) la constituyen genes a los que no se ha podido asignar una función, parecido ocurre con la categoría 26, compuesta por genes categorizados como diversos, con 63 representantes. Por tanto son la categoría 27, compuesta por 97 genes con función en el procesado del ARN, la categoría 29, formada por 62 genes encargados de la síntesis o degradación de proteínas y la categoría 30 o genes encargados de la señalización celular, con 48 representantes; las más interesantes. (ii) En el segundo grupo se engloban las categorías 16 (metabolismo secundario, con 30 genes), 17 (metabolismo hormonal, con 28 genes), 20 (estrés, tanto biótico como abiótico, con 33 genes), 34 (transportadores de membrana, 27 genes) y categoría 1 (fotosíntesis, con 22 genes representados) con porcentajes sobre el total entre el 3 y el 5% (**Figura 52**). De este segundo grupo de categorías destacan los genes relacionados con el metabolismo de las hormonas por su posible influencia en el estolnado. (iii) El tercer grupo está formado por aquellas categorías con menos genes diferencialmente expresados y con funciones muy diversas, algunas de ellas con uno o dos genes representados únicamente (por ejemplo las categorías 8, 14, 19, 22 y 24). Dentro de este tercer grupo podríamos destacar la categoría 33, en la que se incluyen genes relacionados con el desarrollo (**Figura 52**).

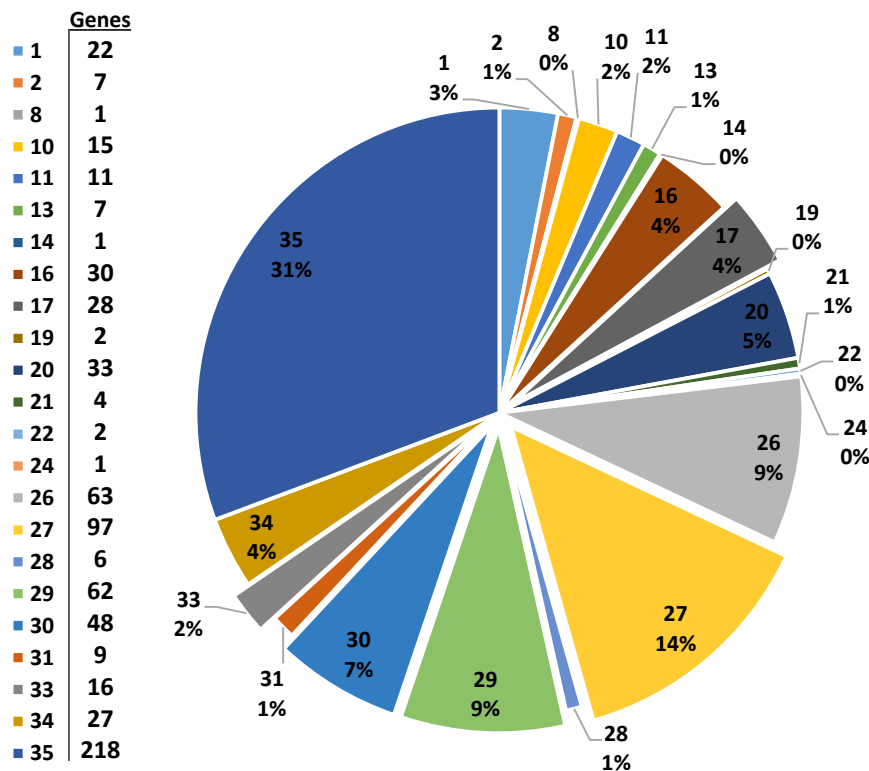


Figura 52. Categorización funcional de los 710 genes con tasa de cambio (Fold change) superior a 2. Adaptado de la esquematización *overview* del programa MapMan. Se representan únicamente las categorías funcionales a las que se le asignó algún gen diferencialmente expresado: 1) Fotosíntesis, 2) Metabolismo de carbohidratos/Glucólisis, 8) Ciclo de Krebs, 10) Pared celular, 11) Metabolismo de lípidos, 13) Metabolismo de aminoácidos, 14) Asimilación de azufre, 16) Metabolismo secundario, 17) Metabolismo hormonal, 19) Síntesis de tetrapirrol, 20) Estrés, 21) Óxido-reducción, 22) Metabolismo de poliaminas, 24) Degradación de xenobióticos, 26) Genes diversos, 27) Procesamiento de ARN, 28) Procesamiento de ADN, 29) Síntesis y degradación de proteínas, 30) Señalización celular, 31) Ciclo celular, 33) Desarrollo, 34) Transportadores de membrana y 35) Sin función asignada. Columna Genes, número de genes presentes en cada categoría.

Usando de nuevo MapMan y la esquematización *Regulation overview* (visión esquemática de los genes relacionados con distintos procesos de regulación en plantas, **Figura 53**) se visualizaron 206 genes (cada cuadrado representa un gen) divididos en diferentes categorías funcionales (específicas de esta esquematización). Además, este esquema nos permite visualizar, gracias a una escala de color, los genes inducidos o reprimidos en el grupo de plantas estolonantes frente al de no estolonantes, los cuales aparecen resaltados en verde o rojo, respectivamente (**Figura 53**). En esta figura destaca en primer lugar el elevado número de factores de transcripción (73 genes), tanto inducidos (41 genes, 56%) como reprimidos (32 genes, 44%), presentes en nuestro análisis. En segundo lugar cabe destacar los genes encargados de la modificación y/o degradación de proteínas, en este caso coincidentes con los identificados en la categoría 29 de la **Figura 52**; así como genes que intervienen en la señalización celular (categoría 48) como son las proteínas kinasas y las proteínas G. En el caso de las proteínas kinasas encontramos exactamente la mitad de los genes inducidos; mientras que ambas proteínas G identificadas están reprimidas en el grupo de plantas estolonantes. En la **Figura 53** sobresalen también genes implicados en con la captación de luz (fotosistemas) y el sistema redox de la planta, ambas rutas reprimidas en las plantas estolonantes. En lo que respecta a genes encargados de la regulación hormonal, de los 28 genes identificados (categoría 17) el 75 % se encuentran sobre-expresados en las plantas estolonantes. En el caso de giberelinas (2 genes) y etileno (15 genes) encontramos únicamente un gen reprimido. Los genes inducidos presentan niveles de sobre-expresión elevados, dado el intenso color verde observado en la **Figura 53**. En las **tablas 20 y 21** ya pudimos observar los altos niveles de expresión y elevadas tasas de cambio de seis de los genes involucrados en la regulación del etileno (en color rojo en las tablas).

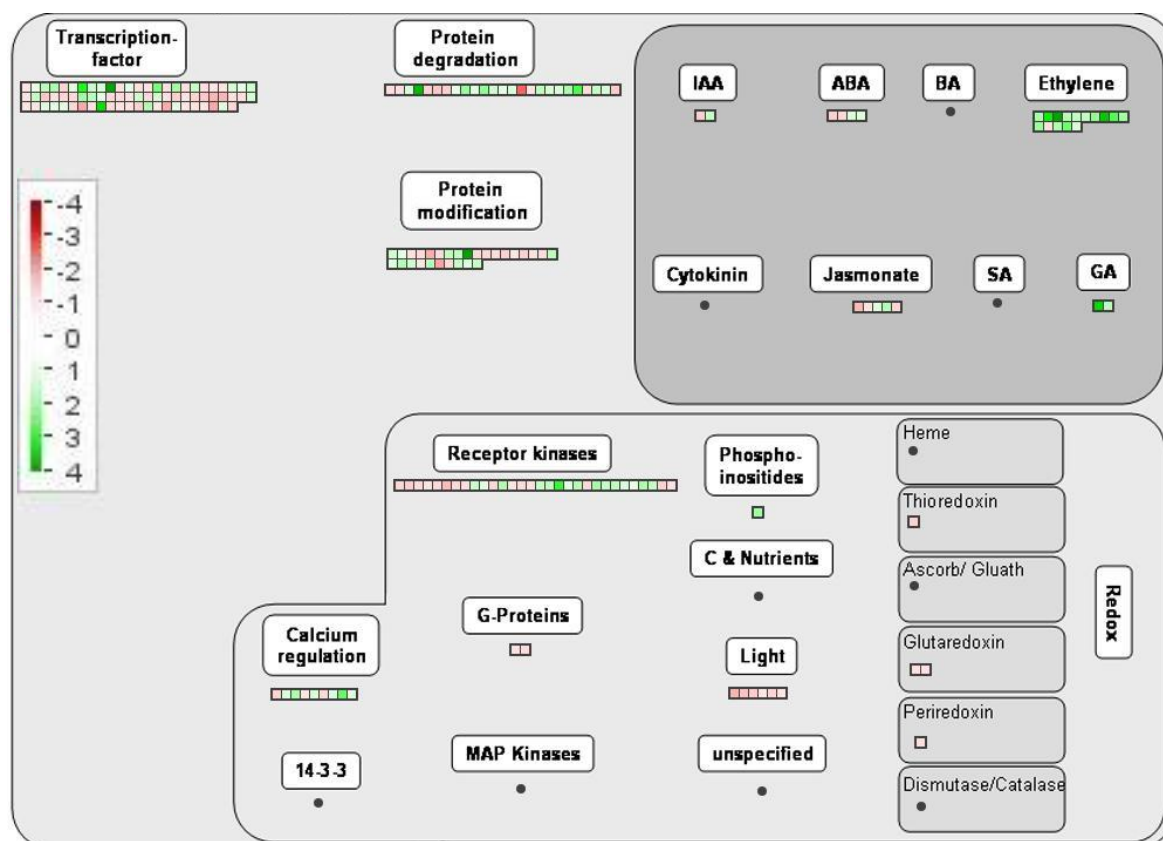


Figura 53. Visión general de la regulación (*Regulation overview*, en MapMan) y los genes que intervienen. Cada gen está representado por un pequeño cuadrado, en el que se representa la expresión (Log2 del cociente de las medias de expresión; RR/NR) mediante una escala de 4 (verde intenso o inducido) a -4 (rojo intenso o reprimido). Se visualizan 206 genes, con un punto negro se identifican aquellas categorías funcionales a las que no se asocia ningún gen.

Como se observa en las **Figuras 52** existe un porcentaje elevado de genes relacionados con el procesamiento del RNA y gran parte de ellos se comportan como factores de transcripción (**Figura 53**). Por ello decidimos centrarnos en los factores de transcripción presentes entre los 710 genes, entre los que identificamos 63 transcritos (9,7% del total) que se corresponden con factores de transcripción descritos en *F. vesca* (según la base de datos PlantTFDB Center for Bioinformatics, Peking University China), de ellos 26 (41%) se encuentran inducidos y 37 (59%) reprimidos, en el grupo de plantas estolonantes (RR²⁰¹³) (**Tabla S4**). En la **Figura 54** observamos cómo se distribuyen estos 63 genes entre diferentes familias de factores de transcripción y en la se presentan los niveles de expresión de cada uno de los genes. Tanto en la **Tabla S4** como la **Figura 54** podemos observar, como la familia AP2/ERF/RAV presenta un número de representantes importante, algunos de ellos con niveles de expresión y tasas de cambio destacadas.

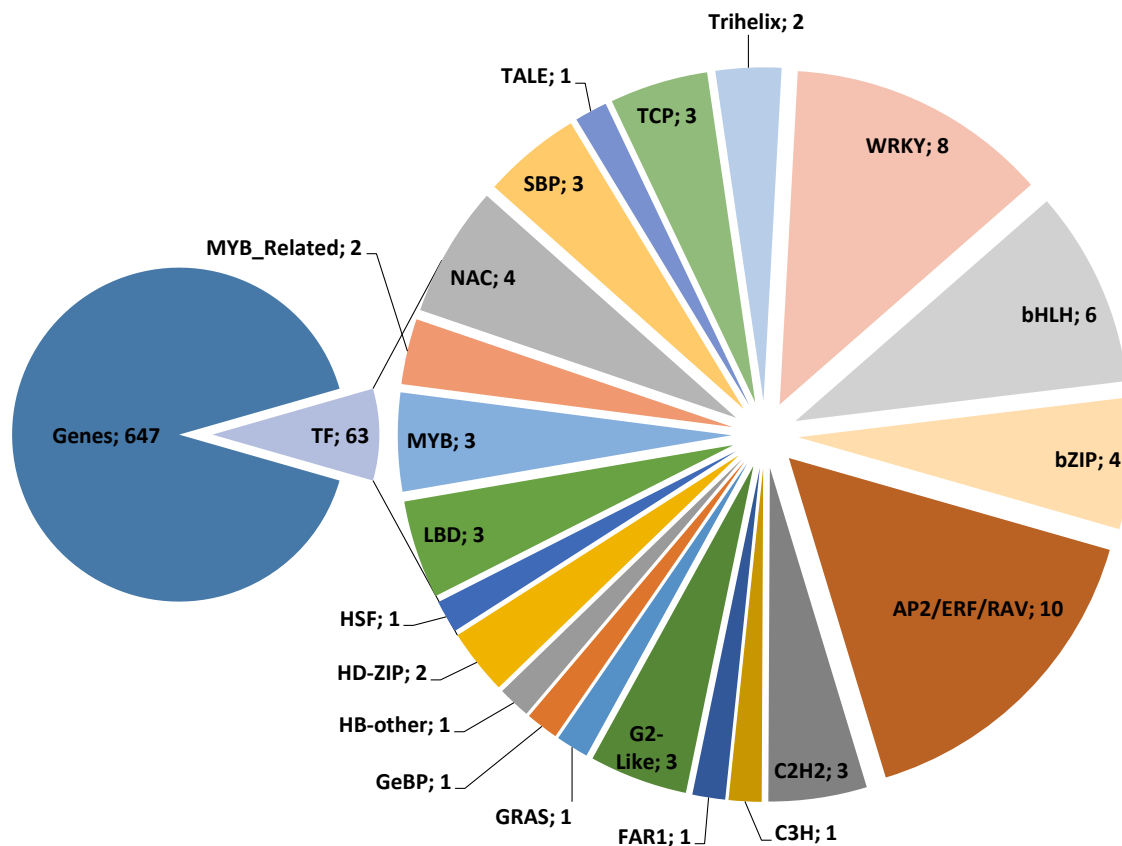


Figura 54. Familia de factores de transcripción con representantes entre los 710 genes con tasa de cambio superior a 2. Se representan los 63 factores de transcripción identificados, según la base de datos PlantTFDB Center for Bioinformatics, Peking University China.

Así, se identificaron un total de 28 genes (3,94 % del total) diferencialmente expresados que están relacionados con el metabolismo del etileno y las giberelinas, 25 se estaban inducidos en el grupo de plantas estolonantes y únicamente tres reprimidos: *gene30773*, *gene28574* y *gene10845* (Tabla 24). A su vez, dieciocho genes codifican para enzimas relacionadas con la biosíntesis o el metabolismo y el resto (diez genes) para factores de transcripción que regulan la expresión génica de ambas rutas.

Respecto del metabolismo del etileno, observamos cinco genes cuya descripción concuerda con genes directamente implicados en la síntesis de esta hormona, todos ellos sobre-expresados en el grupo de plantas estolonantes: *gene22974* (*SAM*, *S-adenosylmethionine synthetase*; número 26); *gene05580* (*ACC synthase*, *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase*, número 8); *gene11421*, *gene08257* y *gene08258* (*ACC oxidase*, *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase*; números 9, 15 y 19) (Tabla 24).

Respecto del metabolismo de las giberelinas, identificamos cuatro genes diferencialmente expresados cuya descripción concuerda con genes implicados en la degradación de esta hormona, concretamente con la enzima dioxigenasa dependiente de

2-oxoglutarato (GA2ox; **Figura 5**): *gene02231*, *gene24392*, *gene00852* y *gene31337* (número 4, 10, 12 y 14 en la **Tabla 24**), los dos últimos genes identificados anteriormente en el estudio de Vallarino *et al.* (2015) y nombrados como: *FaGA2ox1* y *FaGA2ox4*, respectivamente. Todas ellas inducidas en el grupo de plantas estolonantes.

	TF	Gen Fv	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold change	p-value
Eti 1	ERF	gene27604	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	136,58	7,42	129,16	18,41	0,000006
Eti 2		gene08065	Hyoscyamine 6-dioxygenase-like	2,14	0,12	2,02	18,28	0,000018
Eti 3		gene18341	SRG1-like	197,28	15,30	181,98	12,90	0,000001
GA 4		gene02231	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	9,49	0,82	8,67	11,63	0,000001
Eti 5		gene01857	Hyoscyamine 6-dioxygenase-like	42,40	4,16	38,25	10,20	0,000158
Eti 6	ERF	gene21091	Ethylene-responsive transcription factor ERF110	184,75	22,04	162,71	8,38	0,000005
Eti 7		gene20980	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	17,62	2,74	14,88	6,43	0,000037
Eti 8		gene05580	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	0,78	0,14	0,64	5,44	0,000590
Eti 9		gene11421	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like	162,68	37,59	125,08	4,33	0,000589
GA 10		gene24392	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 2	7,49	1,84	5,65	4,06	0,000998
Eti 11		gene22074	---NA---	171,15	44,23	126,93	3,87	0,000019
GA 12		gene00852	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8-like	7,60	2,07	5,54	3,68	0,000000
Eti 13	ERF	gene09137	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-1-like	6,42	1,77	4,66	3,64	0,000216
GA 14		gene31337	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	49,18	14,29	34,89	3,44	0,000416
Eti 15		gene08257	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase H 11-like	21,52	6,65	14,87	3,23	0,000123
GA 16		gene08518	Gibberellin-regulated protein 1	8,07	2,50	5,57	3,23	0,000631
Eti 17	ERF	gene08873	Ethylene-responsive transcription factor ERF039-like	2,05	0,64	1,41	3,20	0,000098
Eti 18		gene08258	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase H1-like	117,36	38,98	78,38	3,01	0,000122
Eti 19		gene10776	Protein srg1-like	379,62	128,45	251,17	2,96	0,000046
Eti 20	ERF	gene21165	Ethylene-response transcription factor 2-like	165,04	58,57	106,48	2,82	0,000309
Eti 21	ERF	gene23873	Ethylene-response transcription factor RAP2-10	15,18	6,06	9,13	2,51	0,000784
Eti 22		gene32532	Ethylene receptor 2	123,45	52,90	70,56	2,33	0,000335
Eti 23	ERF	gene11882	Ethylene-response transcription factor TINY	120,81	56,97	63,84	2,12	0,000037
Eti 24	RAV	gene03871	Ap2/ERF domain-containing transcription repressor TEM1-like	371,33	184,51	186,82	2,01	0,000224
Eti 25		gene22974	S-adenosylmethionine synthetase 2	2808,10	1402,57	1405,53	2,00	0,000335
Eti 26		gene30773	Protein srg1-like	13,24	27,66	-14,41	-2,09	0,000652
Eti 27	AP2	gene28574	Ethylene-responsive transcription factor 109-like	40,15	87,00	-46,84	-2,17	0,000180
Eti 28	ERF	gene10845	Ethylene-responsive transcription factor 5	26,14	65,03	-38,89	-2,49	0,000157

Tabla 24. Genes implicados en el metabolismo del etileno y las giberelinas con diferencias de expresión entre los grupos contrastantes. En verde genes inducidos; en rojo genes reprimidos en el grupo de plantas estolonantes. RR y NR representan la media de expresión (en FPKM) de tres réplicas biológicas independientes. TF, familia de factores de transcripción a la que pertenece. Ordenados de mayor a menor tasa de cambio. Eti, genes relacionados con el metabolismo del etileno. GA, genes relacionados con el metabolismo de las giberelinas.

3.7 Análisis de marcadores SNP DArTseq ligados al carácter del estolonado.

Con el objetivo de identificar marcadores SNPs ligados al carácter estolonado en la población segregante, se realizó un análisis sobre dos grupos de plantas (pools) (**Tabla 16**), usando la plataforma DArTseq (<http://www.diversityarrays.com>; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015). Tras el análisis, se obtuvieron un total de 16 941 marcadores SNPs, de los cuales 432 fueron polimórficos entre el grupo de plantas estolonantes (RR²⁰¹²) y no estolonantes (NR²⁰¹²). La distribución de estos marcadores fue homogénea en el genoma y su frecuencia proporcional al tamaño de los cromosomas/grupos de ligamiento de *F. vesca*, no encontrándose por tanto ligados a ninguna región en concreto (**Tabla 25**). Del total de 432 marcadores SNPs polimórficos localizados, 61 mapearon en un entorno de +/- 10 000 pb alrededor de genes con una expresión diferencial significativa en la experiencia de RNA-seq anterior. Al analizar estos 61 SNPs y su distribución a lo largo del genoma de referencia, encontramos un porcentaje mayor de SNPs asociados a genes pertenecientes al Grupo de

Ligamiento II de *F. vesca*, concretamente son 21 los SNPs que mapean dentro de este grupo de ligamiento, lo que representa el 33,9 % del total de SNPs. El LG II de *F. vesca* representa (por tamaño) únicamente el 15,55 % del total del genoma de esta especie (**Tabla 25**). Por tanto, existe un porcentaje significativamente elevado de marcadores SNPs polimórficos asociados a genes en este LG y por tanto, pudieran estar ligados al carácter del estolonado.

De los 61 SNPs, 24 se encuentran asociados a genes inducidos y 35, se encuentran asociados a genes con una expresión menor en las plantas estolonantes (**Tabla S5**). Únicamente 18 estos SNPs polimórficos se encuentran asociados a genes con tasas de cambio en su expresión superiores a 2, diez de ellos inducidos y 8 reprimidos en las plantas estolonantes (en negrita en la **Tabla S5**).

Al indagar en la función, a partir de los términos GO asociados a cada gen por el programa CLC, no parecen existir genes candidatos cuyas funciones podamos relacionar con enzimas o factores de transcripción implicados con el desarrollo, o bien implicados en el metabolismo de hormonas como el etileno o las giberelinas, los cuales sí parecen tener relación con el estolonado, según los resultados destacadas en el apartado anterior y la bibliografía (Mouhu *et al.*, 2013).

GL	DARTs Polimórficos		DARTs Polimórficos cruzados con RNAseq		Tamaño cromosoma (Mb)	% / Tamaño cromosoma
	DARTs	%/Total	DARTs/RNAseq	%/Total		
1	31	7,18	5 (4)	6,78	22681039	10,59
2	57	13,19	21 (20)	33,90	33308843	15,55
3	44	10,19	8 (8)	13,56	27879571	13,01
4	28	6,48	7 (7)	11,86	23292877	10,87
5	35	8,10	5 (5)	8,47	29328693	13,69
6	46	10,65	11 (11)	18,64	38222195	17,84
7	24	5,56	4 (4)	6,78	23403891	10,93
**	167	38,66	0	0	16100213	7,52
Total	432	100	61 (59)	100	214217322	100

Tabla 25. Resumen de los resultados obtenidos tras el análisis de marcadores DARTs polimórficos entre los grupos contrastantes, de la población ‘Endurande’ x ‘Parker’, para el carácter estolonado en la temporada 2012. En azul marcadores polimórficos. En rojo, marcadores DARTs en la proximidad de genes diferencialmente expresados por RNA-seq. Entre paréntesis número de genes a los que se asocian los SNPs. En las dos últimas columnas se muestra el tamaño (en Mb) de cada cromosoma de *F. vesca* y su porcentaje respecto del total del genoma. ** *Loci* no asignados a ningún grupo de ligamiento (LG). Datos obtenidos del NCBI, genome assembly information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000184155.1.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. Discusión.

La fresa cultivada posee la capacidad de reproducirse asexualmente a partir de estolones, que dan lugar a plantas hijas, idénticas genéticamente a la planta madre. La reproducción asexual por estolonado permite la multiplicación y la conservación de las características varietales propias de cada cultivar. Por ello es un carácter de una enorme utilidad para la industria viverística, encargada de multiplicar y suministrar las plantas a los productores (Simpson y Sharp, 1988). Esto unido a la creciente importancia adquirida por las variedades de floración perpetua, que presentan una capacidad menor para estolonar (Heide y Sønsteby, 2007), lo que dificulta su multiplicación en viveros (Hancock *et al.*, 2002), hace al estolonado un carácter muy importante en los programas de mejora. Por ello, el estudio del control genético y los mecanismos moleculares que controlan este carácter es de crucial importancia para la correcta evolución del cultivo.

En la fresa diploide *F. vesca*, el estolonado es controlado por un *locus* dominante denominado *RUNNERING* (*R*). En 1965, Brown and Bareing observaron que las plantas capaces de estolonar presentaban el alelo dominante '*R*', mientras que otras variedades, como 'Baron Solemacher' y 'Bush White' presentaban el alelo recesivo '*r*' en el mismo *locus* y ello las hacía incapaces para estolonar. En 1997, Davis y Yu, realizaron un mapa de ligamiento de *F. vesca* y determinaron que el *locus R* se encuentra localizado en el LG II. La existencia del *locus R* y su posición en el LG II ha sido comprobada con posterioridad en diversos trabajos (Sargent *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Iwata *et al.*, 2012). En los cultivares de floración estacional (SF, tanto en *F. × ananassa* como *F. vesca*), la floración y el estolonado son procesos antagónicos, que no coinciden en el tiempo. Los días largos y las altas temperaturas promueven el crecimiento vegetativo y la formación de estolones, mientras que condiciones de SD favorece la formación de coronas secundarias (e inhiben el estolonado), aumentando el número de meristemos apicales capaces de diferenciarse en inflorescencias y flores (Heide 1977; Battey *et al.*, 1998; Konsin *et al.*, 2001; Hytönen *et al.*, 2004; Heide y Sønsteby, 2007; Hytönen *et al.*, 2009; Hytönen y Elomaa, 2011). Sin embargo, en los cultivares de floración perpetua, ambos procesos se solapan en el tiempo y compiten por los mismos meristemos (Battey *et al.*, 1998).

En la fresa diploide, el alelo dominante del gen *SEASONAL FLOWERING LOCUS* (*SFL*) que controla la floración estacional se hereda independientemente del alelo dominante en el *locus R* (Albani *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2004). Es decir, ambos caracteres están controlados por genes no ligados. Sin embargo, estudios recientes en la especie cultivada, *F. × ananassa*, han mostrado un control genético de ambos caracteres diferente (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015, Perrote *et al.*, 2016). Estos estudios coinciden en la identificación de un QTL mayoritario en el grupo de homoeología

IV que afecta de manera inversa a la floración perpetua y al estolonado. Este resultado concuerda con el hecho de que las variedades de fresa de floración perpetua se asocian frecuentemente con un número menor de estolones (Heide y Sønsteby, 2007). Sin embargo, en estos mismos trabajos otros QTL de menor importancia han sido identificados (Gaston *et al.*, 2013; Sooriyapathirana *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que el control de estos caracteres (floración perpetua y estolonado) es poligénico, controlado por un gen mayor y modulada su función por varios genes más. Sin embargo, estos genes aún no han sido identificados ni caracterizados, por lo que se necesitan más estudios para profundizar en el control genético y el mecanismo molecular detrás del estolonado en la fresa cultivada.

4.1 La población 'Endurance' × 'Parker' es segregante para el estolonado.

Con el objetivo de determinar si el *locus R*, es el responsable del mismo carácter en la fresa cultivada, se analizó una población F_2 segregante de 137 líneas, obtenida por cruzamiento de las variedades 'Endurance' y 'Parker' y posterior autofecundación del individuo F_1 PS6-2. Una característica clave de esta población es que tanto 'Parker' como 'Endurance' son variedades de SD, con lo que el carácter de floración perpetua (o día neutro) no está segregando en esta población y por tanto presentan un *locus FaPFRU* funcional. Esto supone una ventaja a la hora de estudiar el estolonado ya que permitiría la identificación de otros *loci* que pudieran estar implicados en el carácter del estolonado independientes de la floración. El análisis de la población segregante durante tres campañas consecutivas nos permitió conjeturar que el carácter estolonado en esta población esté regido por un único gen, ya que las frecuencias de plantas estolonantes y no estolonantes se ajustaron a una segregación 3:1 ($p < 0,05$, test Chi-cuadrado). Al igual que ocurre en las variedades diploides, en la especie octoploide el alelo estolonante 'R' fue dominante sobre el no estolonante (Albani *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2004; Cordero-Alba, 2010). Esta fue nuestra hipótesis de partida. Sin embargo, el hecho de que algunos de los individuos que no estolonaron el primer año, si lo hicieran en los sucesivos o viceversa, apunta a que el carácter estolonado se ve influenciado por efectos de otros *loci* minoritarios y/o por el ambiente y el estado fisiológico de cada individuo. En un intento de minimizar estos efectos adversos, sobre las frecuencias de estolonado y por tanto sobre el posterior análisis y mapeo poblacional, los individuos que presentaban síntomas de enfermedad o debilidad no se tuvieron en cuenta y fueron descartados (3 individuos); así como los individuos que murieron (7 individuos) durante el experimento y no pudieron ser reemplazados. Una aproximación más adecuada al problema, hubiera sido tratar el estolonado, como un carácter cuantitativo (QTL), evaluando el número de estolones que cada individuo era capaz de producir, en cada una de las campañas. Trabajando de esta manera, con posterioridad al comienzo de nuestro trabajo, varios grupos han identificado QTLs que controlan el estolonado junto con la floración perpetua (Gaston *et al.*, 2013;

Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015; Perrote *et al.*, 2016). Estos QTLs actuarían como un gen mayor, que controla ambos procesos de una forma inversa, efecto positivo sobre la floración perpetua y negativa sobre el estolonado. Estos QTLs se localizan en el mismo HG IV, pero han sido identificados independientemente y en diferentes poblaciones, por lo que no se puede concluir que sean el mismo *locus*, aunque es muy probable (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015). Pero la acción inversa observada para estos QTLs sobre la floración perpetua y el estolonado, no implica necesariamente que este QTL situado en el HG IV sea el responsable del estolonado en la fresa cultivada, ya que el carácter de floración perpetua siempre se asocia a una menor producción de estolones (Heide y Sønsteby, 2007) por lo que la hipótesis de que el estolonado esté controlado en *F. × ananassa* de una manera similar a *F. vesca* no es descartable. En este sentido es de remarcar, que Gaston *et al.* (2013) identifican otros QTLs que controlan el estolonado en su población, exactamente tres más (todos ellos con un efecto positivo sobre la producción de estolones), y uno de ellos en el HG II, al igual que ocurre en la especie diploide (Albani *et al.*, 2004; Sargent *et al.*, 2004).

El análisis por BSA de la población 'Endurance' × 'Parker', fue realizado en una primera aproximación con 224 combinaciones de cebadores AFLPs diferentes. Cada combinación de cebadores usados produjo una media de 102 bandas en los geles de AFLPs. Teniendo en cuenta el número de combinaciones usadas, el número medio de bandas polimórficas por combinación que se estimó en 14,5, y un tamaño estimado del mapa genético de *F. × ananassa* en 2500 cM (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008), al final del escrutinio la cobertura del análisis fue de aproximadamente un marcador cada 0,8 cM. A pesar del alto escrutinio del genoma, de las 224 combinaciones de cebadores de AFLPs usadas, únicamente dos parejas: E25M30 y E26M31, dieron posibles bandas asociadas al carácter del estolonado (Cordero-Alba, 2010). De estos dos posibles marcadores, finalmente solo fue reproducible uno de ellos (E26M31-580). El marcador desechado (usando las combinaciones E25M30) presentó una elevada tasa de recombinantes. Además su gran tamaño (superior a 1100 pb) dificultaba su amplificación, dando lugar a geles difíciles de puntuar e incluso a resultados inconsistentes como ausencia de la banda en los parentales o la F₁.

El genotipado con el marcador AFLPs E26M31-580 (**Figura 48**) se usó para generar el mapa de ligamiento flanqueante al *locus R* y a la vista de los resultados, podemos concluir que este marcador AFLP identificado por BSA se encuentra ligado a la capacidad de estolonado, ya que obtuvimos un mapa de ligamiento con un LOD \geq a 3.0 (equivalente a decir que el ligamiento es 1000 veces más probable que el no ligamiento), en al menos dos casos (campaña 2009 LOD = 5,63; 2008/2009 LOD = 3,29) (**Figura 49** y **Tabla 15**). Además, el marcador E26M31-580 pb, fue detectado ligado al carácter de estolonado en tres

ocasiones más, aunque el LOD obtenido se encontró por debajo de 3.0, pero estos resultados apoyan la hipótesis de ligamiento entre el carácter y el marcador. Aunque el marcador AFLP E26M31-580, se encuentra ligado a la capacidad de estolonado, la distancia a la que mapea del mismo es grande (25.9 - 35.6 cM dependiendo del año de análisis) y por tanto la probabilidad de recombinación entre el marcador y el *locus R*, es elevada. Debido a esto la probabilidad de que el marcador identificado y la capacidad de estolonado segreguen por separado (independientemente) será también alta. Esto inhabilita al marcador para la selección del carácter estolonado y su uso en un programa de mejora vegetal. Además, al tratarse de un marcador AFLP, no conocemos su posición en el genoma.

En una segunda aproximación, realizamos un análisis BSA equivalente pero usando marcadores más informativos, como son los SSRs. Ninguno de los marcadores SSR evaluados durante este trabajo se detectó ligado al *locus R* (**Tabla 17** y **Tabla S5**). Los marcadores utilizados se eligieron repartidos de una manera homogénea por todos los grupos de homeología de la fresa cultivada y en amplio número (Zorrilla-Fontanesi *et al.*, 2011), en un intento por identificar el grupo de ligamiento de carácter estolonado.

4.2 El cultivar ‘Endurance’ es responsable de la segregación del estolonado en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’.

A la vista de los resultados de la población de muestreo, se diseñó un experimento de auto-fecundación de los parentales de la misma, con el objeto de evaluar el origen de la mutación causal de la deficiente capacidad para estolonar observada en las dos primeras temporadas de seguimiento, y que se repitieron durante las tres campañas posteriores. En el banco de germoplasma del centro IFAPA de Churriana (Málaga) tanto ‘Endurance’ como ‘Parker’ (cultivares usados como parentales) son capaces de estolonar eficientemente. Sin embargo, las plantas obtenidas mediante la autofecundación del individuo F₁ PS6-2 muestran deficiencias en su capacidad para estolonar (**Tabla 14** y **Tabla S4**), ajustándose la misma a una segregación 3:1 típica de un gen con herencia mendeliana simple. Las plantas generadas con la auto-fecundación de ‘Parker’ estolonaron con normalidad. Sin embargo, doce plantas de la auto-fecundación de ‘Endurance’ no consiguieron estolonar durante al menos cinco años. Como ya explicamos anteriormente, en la fresa silvestre el estolonado está controlado por el *locus R*, las plantas con el alelo dominante (*R*) estolonan y las que presentan el alelo recesivo (*r*) en homocigosis no producen estolones (Brown y Bareing, 1965). Los resultados obtenidos con las auto-fecundaciones de las accesiones de fresa octoploide ‘Endurance’ y PS6-2 están en consonancia con lo que ocurre en la especie diploide, por lo que el estolonado en la fresa cultivada se controlaría de una forma similar, con un gen mayoritario dominante. El cultivar ‘Endurance’ sería por tanto heterocigoto

para el *locus R*, la mitad de su descendencia tras su auto-fecundación presentaría el alelo recesivo, este sería el caso del individuo F₁ PS6-2.

En las dos últimas campañas de seguimiento de la población de muestreo, se realizó un conteo del número de estolones producidos por cada planta, en un principio para reestructurar los grupos para BSA. De esta forma pudimos observar que existía una variabilidad dentro de la población, con plantas, que producían un número de estolones normal todos los años y otro grupo de plantas (más reducido, 7 plantas) que no estolonaron nunca. Entre ambos extremos, existió toda una graduación de respuestas, pero en general las plantas que no estolonaron en alguna de las temporadas, producían pocos estolones (**Tabla S4**). Este rango de respuestas y el hecho de que algunas plantas consiguieran estolonar tras pasar temporadas sin estolonar o viceversa, nos inclinan a pensar en un control similar al de *F. vesca* pero modulado por otros genes minoritarios, que modulan la respuesta de la planta e influenciados por el medio ambiente y/o el estado nutricional de la planta, controlan el estolonado en la fresa cultivada. En consonancia con esta hipótesis, vemos como al cruzar los datos de expresión diferencial (obtenidos mediante RNA-seq) con el análisis de SNP usando la plataforma DArTseq, encontramos un porcentaje mayor de SNPs asociados a genes pertenecientes al Grupo de Ligamiento II de *F. vesca*, concretamente son 20 (21) un 33,9 % del total de SNPs asociados (**Tabla 25**). Sin embargo, el Grupo de ligamiento II de *F. vesca* representa (por tamaño) únicamente el 15,55 % del total del genoma de esta especie (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008) por lo que la frecuencia de SNPs en este grupo de ligamiento es mayor a la esperada. Esto podría deberse a que el *locus R* se encontraría localizado en el mismo grupo de ligamiento en la fresa cultivada que en *F. vesca* (Brown y Bareing, 1965; Davis y Yu, 1997; Sargent *et al.*, 2004, 2006 y 2009; Iwata *et al.*, 2012). En nuestro trabajo, al usar variedades de fresa de día corto, podemos estudiar genes directamente relacionados con la inducción del estolonado, evitando el papel inhibitorio que el *locus FaPFRU* ejerce sobre este carácter, como ha sido mostrado por otros grupos (Gaston *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015; Sooriyapathirana *et al.*, 2015, Honjo *et al.*, 2016; Perrote *et al.*, 2016). En estos trabajos el efecto negativo sobre el estolonado que observan del QTL identificado, se debe a la relación negativa que efectivamente tiene la floración perpetua sobre el estolonado, al competir ambos procesos directamente por los meristemas susceptibles en los días largos (Battey *et al.*, 1998; Heide y Sønsteby, 2007; Hytönen y Elomaa, 2011).

Sin embargo, a pesar del elevado número de marcadores utilizados, no hemos podido determinar la localización de este *locus R* en el genoma de la fresa cultivada. Posiblemente, el carácter es más complejo de lo que anticipamos y esté influenciado en mayor o menor medida por el ambiente. En este sentido, un análisis clásico de QTLs, usando los datos cuantitativos de producción de estolones de los dos últimos años sería

una aproximación más acertada. Para ello sería necesario la elaboración de un mapa de ligamiento, lo que requeriría genotipar la población completa con gran número de marcadores distribuidos por todo el genoma. En vista de los resultados que hemos obtenido mediante BSA con marcadores AFLP y SSRs, posiblemente el *locus* se encuentre en una zona poco polimórfica, lo que ha limitado la identificación de marcadores ligados.

4.3 Las giberelinas y el etileno juegan un papel importante en el control del estolonado en *Fragaria* × *ananassa*.

El papel de las giberelinas (GA) como reguladores del estolonado fue ya sugerido por Guttridge y Thompson en 1964. Ellos mostraron como la aplicación de GA exógena activa el estolonado en SD y que incluso hace estolonar a variedades de fresa que normalmente no estolonan (Guttridge y Thompson, 1964).

En nuestro experimento por RNA-seq han sido identificados cuatro genes, cuya descripción concuerda con la enzima dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (GA2ox) encargada de la degradación de giberelinas activas (Yamaguchi, 2008). Concretamente hablamos de las predicciones sobre el genoma de *F. vesca* nombradas como: *Fvgene02231-v1.0-hybrid*, *Fvgene24392-v1.0-hybrid*, *Fvgene00852-v1.0-hybrid* y *Fvgene31337-v1.0-hybrid*, todas ellas sobre-expresadas en el grupo de plantas estolonates (**Tabla 24**). Aunque estos genes aun no han sido bien caracterizados en *Fragaria*, las dos últimas predicciones se encuentran diferencialmente sobre-expresadas en frutos de fresa tras un tratamiento con giberelinas activas (Vallarino *et al.*, 2015). De la misma forma, en *F. vesca* ha sido descrita una disminución de la expresión de esta enzima (de siete ordenes de magnitud) tras un tratamiento con prohexadiona cálcica (inhibidora de la síntesis de GAs), mientras que fotoperiodos de SD producen una disminución de la expresión aproximadamente en un 50% en los meristemas (Hytönen *et al.*, 2009;). Cuando los niveles de GA activas en el meristemo son reducidos, se favorecen la formación de coronas secundarias y *a posteriori* la inducción floral si las condiciones son adecuadas, a la vez que se aumenta la productividad del cultivo (Braun y Kender, 1985; Braun y Garth, 1986; Wiseman y Turnbull, 1999a y 1999b; Black, 2004; Hytönen *et al.*, 2008; Hytönen *et al.*, 2009; Hytönen y Elomaa, 2011). Tanto en el caso de los frutos como en el meristemo, la expresión (alta o baja) de Ga2ox se relaciona con una alta o baja (respectivamente) actividad o nivel de giberelinas activas, acompañado de un estricto control de los niveles de las mismas, en los que el producto (las giberelinas) activan su degradación a la vez que inhiben su biosíntesis, para mantener una situación de homeostasis (Yamaguchi, 2008; Schwechheimer, 2008). Por lo tanto, una mayor expresión de la enzima GA2ox en los meristemas de las plantas estolonantes frente a las no estolonantes se relacionaría con niveles de giberelinas activas

mayores, capaces de inducir el estolonado en condiciones de LD, que es cuando se realizó el muestreo y donde el grupo de plantas RR²⁰¹³ se encontraban estolonando.

En esta tesis hemos descrito el efecto positivo que la sobre-expresión de *FaSOC1* tiene sobre el estolonado, promoviendo la producción de estolones incluso en condiciones de SD (ver discusión capítulo 2) y lo hemos asociado a un posible aumento de giberelinas a nivel de los meristemas, tal y como se ha mostrado en *F. vesca* (Mouhu *et al.*, 20013). Sin embargo, en nuestra experiencia de RNA-seq, el transcrito *FvGene19425-v1.0-hybrid*, homólogo a *FaSOC1* en la fresa diploide no mostró diferencias de expresión significativas entre las plantas estolonantes y no estolonantes (datos no mostrados). Por lo tanto, en el aumento de los niveles de giberelinas, deben intervenir más actores, que ayuden a mantener bajo control los niveles de giberelinas y ha modular la respuesta de los meristemas. En el grupo de plantas no estolonantes, algunos de estos actores (no identificado en nuestro experimento **Tabla S8**), se encuentra alterado.

Se conocen multitud de procesos del desarrollo o fisiología de las plantas en los que interviene el etileno, como la germinación de la semilla, la elongación celular, la formación de la raíz, la floración, la maduración del fruto o la respuesta frente al estrés, tanto biótico como abiótico (Bleecker y Kende, 2000). Aun así, no se conocen trabajos que relacionen directamente esta hormona con la producción de estolones u otros procesos vitales de la fresa, a excepción de los trabajos realizados sobre la maduración del fruto (Perkins-Veazie, 1995; Iannetta *et al.*, 2006; Merchante *et al.*, 2013). Esto unido a que los estudios sobre el estolonado en general, también son escasos, nos dificulta sobre manera la discusión de los resultados obtenidos al estudiar el transcriptoma de las plantas de la población de mapeo. Al igual que ocurre con las giberelinas, en nuestro RNA-seq hemos identificado varios genes relacionados con la síntesis de etileno, sobre-expresados en el grupo de plantas estolonantes. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el etileno podría estar acumulándose e interviniendo en el estolonado. De qué forma la alta expresión de los genes relacionados con la síntesis y la respuesta a etileno influye en este proceso, es difícil de discernir. Una posible vía de actuación del etileno sería a través de las giberelinas, ya que ambas fitohormonas parecen tener más actividad en plantas que están estolonando. La interacción entre giberelinas y etileno es un poco compleja, ya que han sido descritos efectos recíprocos entre ambas fitohormonas, tanto positivos como negativos, dependiendo de las circunstancias y/o el tejido al que nos refiramos, además la interacción entre ambas hormonas se produce tanto a nivel de biosíntesis como a nivel de señalización celular (Weiss y Ori; 2007; De Grauwe *et al.*, 2007; Dugardeyn *et al.*, 2008; Achard y Genschik, 2009). En *Arabidopsis*, el etileno inhibe el crecimiento y retrasa la floración de una manera antagónica a las GA (Achard *et al.*, 2003; Achard *et al.* 2007; De Grauwe *et al.*, 2007). Y al contrario, el etileno y las giberelinas actúan conjuntamente en la elongación de

tallos sumergidos de arroz, sometidos a un fuerte estrés por falta de oxígeno (Sauter *et al.*, 2005) y en la producción de raíces adventicias en las partes sumergidas (Steffens *et al.*, 2006). Todos estos mecanismos, son un ejemplo de la complejidad y el elevado control que se produce en la interacción entre estas dos fitohormonas. En vista de nuestros resultados, es posible que durante el estolonado, el etileno y las giberelinas actúen conjuntamente para favorecer el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de la fresa cultivada. El etileno podría promover la degradación de las proteínas DELLA (**Figura 5**), fuertes represoras del crecimiento vegetativo en las plantas (Achard y Genschik, 2009). O también es posible, que el etileno de alguna forma ayude a mantener los niveles de GA estables (homeostasis). Ambas ideas, deberían ser contrastadas mediante estudios más exhaustivos. En este sentido, la caracterización funcional de los genes que intervienen en la biosíntesis de ambas hormonas en *Fragaria* sería de gran ayuda.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 4

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo 4: Conclusiones.

1. Hemos identificado y caracterizado el gen *FaCO* en *Fragaria × ananassa*, ortólogo del gen *CONSTANS* de *Arabidopsis thaliana*. Su expresión se encuentra regulada claramente por el ritmo circadiano. La oscilación diurna exhibida por *FaCO*, con máxima expresión al final del periodo de oscuridad, es similar a la presentada por su ortólogo en la fresa silvestre *FvCO*, y otros homólogos como *GmCOL1a* y *b*, *VvCO* y *StCOL1*, en soja, vid y patata, respectivamente. Este patrón contrasta con el descrito en *Arabidopsis thaliana* para *AtCO*, donde el pico de expresión coincide con el final del periodo de luz, durante la tarde de los LD.
2. La sobre-expresión constitutiva de *FaCO*, mediante el promotor 35S, afecta negativamente al crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de la fresa cultivada. No se ha observado una influencia clara de este gen sobre el control fotoperiódico de la floración.
3. Hemos identificado dos genes con similitud a *FLOWERING LOCUS D* pertenecientes a la familia bZIP de factores de transcripción de *Fragaria × ananassa*, nombrados como *FaFD* y *FaFD2*. Los patrones de expresión de ambos genes son diferentes, con la expresión de *FaFD* localizada específicamente en la corona, mientras que la expresión de *FaFD2* es alta en hoja, corona y raíz.
4. La sobre-expresión constitutiva de *FaFD2* adelanta la floración, por lo que este gen representar una herramienta útil para generar fresas más precoces. Sin embargo, la sobre-expresión no afectó significativamente la floración en condiciones no inductoras (LD).
5. Hemos caracterizado el gen *FaSOC1* de *Fragaria × ananassa* y demostrado una función equivalente a su ortólogo *FvSOC1* de *Fragaria vesca*. La expresión de *FaSOC1* es mayor en condiciones no inductoras de floración (LD) en todos los cultivares analizados, tanto en hoja, raíz como en corona.
6. La sobre-expresión constitutiva de *FaSOC1* en *Fragaria × ananassa* retrasa la floración, promueve el estolonado y la elongación de peciolo e inflorescencias, afecta a la morfología floral y dificulta la correcta maduración de los frutos. La función de *SOC1* en la regulación de la floración en *Fragaria* es por tanto antagónica a la mostrada por el ortólogo en *Arabidopsis thaliana*.

7. La expresión del gen *FaAGL6* de *Fragaria* × *ananassa*, que se limita a la flor y al fruto verde, sugiere un papel homeótico de este gen en el desarrollo floral. La sobre-expresión constitutiva de este gen no afectó la floración en el cultivar ‘Camarosa’.
8. Hemos identificado un marcador AFLP ligado al carácter del estolonado, aunque no hemos podido localizar el grupo de ligamiento en el que se encuentran en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’.
9. El defecto en el estolonado observado en la población ‘Endurance’ × ‘Parker’ procede del cultivar ‘Endurance’ el cual, al ser capaz de estolonar normalmente, debe presentar un genotipo heterocigoto (*Rr*).
10. El análisis de expresión diferencial por RNA-seq, sobre los grupos contrastantes para el carácter del estolonado, ha mostrado una mayor expresión de genes relacionados con la biosíntesis y el metabolismo del etileno y las giberelinas en las plantas estolonantes.

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía.

A

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052-1056.
- Abelenda JA, Cruz-Oró E, Franco-Zorrilla JM, Prat S** (2016) Potato *StCONSTANS-like1* Suppresses Storage Organ Formation by Directly Activating the FT-like StSP5G Repressor. *Current Biology* **26**: 872-881.
- Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T, Harberd NP** (2007) The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 6484-6489.
- Achard P, Genschik P** (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of experimental botany* **60**: 1085-1092.
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP** (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* **15**: 2816-2825.
- Adamczyk BJ, Lehti-Shiu MD, Fernandez DE** (2007) The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **50**: 1007-1019.
- Aharoni A, Keizer LC, Van Den Broeck HC, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RC, O'Connell AP** (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and-independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology* **129**: 1019-1031.
- Ahmadi H, Brighurst RS, Voth V** (1990) Modes of inheritance of photoperiodism in *Fragaria*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 146-152.
- Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, Henz SR, Brady RL, Weigel D** (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO journal* **25**: 605-614.
- Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmensiek A, Kuchel H** (2006) Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and applied genetics* **113**: 1409-1420.
- Akhunov E, Nicolet C, Dvorak J** (2009) Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 507-517.

- Albani M, Battey N, Wilkinson M** (2004) The development of ISSR-derived SCAR markers around the *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)* in *Fragaria vesca*. Theoretical and applied genetics **109**: 571-579.
- Albani MC, Coupland G** (2010) Chapter Eleven - Comparative analysis of flowering in annual and perennial plants. In: CPT Marja, ed, Current Topics in Developmental Biology, Vol Volume 91. Academic Press, pp 323-348.
- Almada R, Cabrera N, Casaretto JA, Ruiz-Lara S, Villanueva EG** (2009) *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. Plant cell reports **28**: 1193-1203.
- Alsheikh M, Suso H-P, Robson M, Battey N, Wetten A** (2002) Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. vesca* cv *semperflorens*. Plant Cell Reports **20**: 1173-1180.
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF** (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. The Plant Journal **24**: 457-466.
- Amasino R** (2010) Seasonal and developmental timing of flowering. The Plant Journal **61**: 1001-1013.
- Andrés F, Coupland G** (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. Nature Reviews Genetics **13**: 627-639.
- Archbold D, Dennis Jr F** (1984) Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. Journal of the American Society for Horticultural Science.
- Archbold D, Dennis Jr F** (1985) Strawberry receptacle growth and endogenous IAA content as affected by growth regulator application and achene removal. Journal of the American Society for Horticultural Science (USA).
- Aukerman MJ, Sakai H** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. The Plant Cell **15**: 2730-2741.

B

- Baloglu MC, Eldem V, Hajyzadeh M, Unver T** (2014) Genome-wide analysis of the bZIP transcription factors in cucumber. PLoS One **9**: e96014.
- Barceló M, El-Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Alfaro FP** (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **54**: 29-36.
- Bassil NV, Davis TM, Zhang H, Ficklin S, Mittmann M, Webster T, Mahoney L, Wood D, Alperin ES, Rosyara UR** (2015) Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa*. BMC genomics **16**: 1.

- Battey N, Miere PI, Tehranifar A, Cekic C, Taylor S, Shriver K, Hadley P, Greenland A, Darby J, Wilkinson M** (1998) Genetic and environmental control of flowering in strawberry.
- Battey NH, Tooke F** (2002) Molecular control and variation in the floral transition. *Current opinion in plant biology* **5**: 62-68.
- Bäurle I, Dean C** (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**: 655-664.
- Becker A, Theißen G** (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular phylogenetics and evolution* **29**: 464-489.
- Bemer M, Wolters-Arts M, Grossniklaus U, Angenent GC** (2008) The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *The Plant Cell* **20**: 2088-2101.
- Benbouza H, Jacquemin J-M, Baudoin J-P, Mergeai G** (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **10**: 77-81.
- Black BL** (2004) Prohexadione-calcium decreases fall runners and advances branch crowns of 'Chandler' strawberry in a cold-climate annual production system. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 479-485.
- Blázquez MA, Ahn JH, Weigel D** (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics* **33**: 168-171.
- Blázquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D** (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *The Plant Cell* **10**: 791-800.
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 1-18.
- Blümel M, Dally N, Jung C** (2015) Flowering time regulation in crops—what did we learn from *Arabidopsis*? *Current opinion in biotechnology* **32**: 121-129.
- Bombarely A, Merchante C, Csukasi F, Cruz-Rus E, Caballero JL, Medina-Escobar N, Blanco-Portales R, Botella MA, Muñoz-Blanco J, Sánchez-Sevilla JF** (2010) Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC genomics* **11**: 503.
- Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleißner R, Wisman E, Apel K, Melzer S** (2000) A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **24**: 591-599.
- Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR** (2002) Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* **162**: 887-895.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* **32**: 314.
- Bradford E, Hancock JF, Warner RM** (2010) Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**: 102-107.
- Braun J, Garth J** (1986) Strawberry vegetative and fruit growth response to paclobutrazol. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*.
- Braun J, Kender W** (1985) Correlative bud inhibition and growth habit of the strawberry as influenced by application of gibberellic acid, cytokinin, and chilling during short daylength. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 28-34.
- Bringhurst RS** (1990) Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. *HortScience* **25**: 879-881.
- Brown T, Wareing P** (1965) The genetical control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica* **14**: 97-112.
- Bustamante CA, Civello PM, Martínez GA** (2009) Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit. *Plant Science* **177**: 49-56.

C

- Castro P, Bushakra J, Stewart P, Weebadde C, Wang D, Hancock J, Finn C, Luby J, Lewers K** (2015) Genetic mapping of day-neutrality in cultivated strawberry. *Molecular Breeding* **35**: 1-16.
- Chailakhyan MK** (1936) About the mechanism of the photoperiodic response. *In Dokl Akad Nauk SSSR, Vol 1*, pp 85-89.
- Collard B, Jahufer M, Brouwer J, Pang E** (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* **142**: 169-196.
- Concha CM, Figueroa NE, Poblete LA, Oñate FA, Schwab W, Figueroa CR** (2013) Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant physiology and biochemistry* **70**: 433-444.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C** (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *science* **316**: 1030-1033
- Cordero-Alba M** (2010) Identificación de marcadores AFLPsligados al estolonado de la fresa (*Fragaria* \times *ananassa*).

Corrêa LGG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincenz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* **3**: e2944.

Cseke LJ, Zheng J, Podila GK (2003) Characterization of *PTM5* in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene* **318**: 55-67.

Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, Kitamura J, Giavalisco P, Nakajima M, Fernie AR, Rathjen JP, Botella MA, Valpuesta V (2011) Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist* **191**: 376-390.

D

De Vienne D (2003) Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Science Publishers, Enfield. Pages: 3 – 46.

Darrow GM (1966) The strawberry. History, breeding and physiology.

Darwish O, Shahan R, Liu Z, Slovin JP, Alkharouf NW (2015) Re-annotation of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) genome. *BMC genomics* **16**: 1.

Davis T, Denoyes-Rothan B, Lerceteau-Köhler E (2007) Strawberry. *In* Fruits and Nuts. Springer, pp 189-205.

Davis T, Yu H (1997) A linkage map of the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Journal of Heredity* **88**: 215-221.

De Folter S, Immink RG, Kieffer M, Pařenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *The Plant Cell* **17**: 1424-1433.

De Grauwe L, Dugardeyn J, Van Der Straeten D (2008) Novel mechanisms of ethylene-gibberellin crosstalk revealed by the *gai eto2-1* double mutant. *Plant signaling & behavior* **3**: 1113-1115.

De Grauwe L, Vriezen WH, Bertrand S, Phillips A, Vidal AM, Hedden P, Van Der Straeten D (2007) Reciprocal influence of ethylene and gibberellins on response-gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 485-498.

Degani C, Rowland LJ, Saunders JA, Hokanson SC, Ogden EL, Golan-Goldhirsh A, Galletta GJ (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica* **117**: 1-12.

Díaz-Riquelme J, Lijavetzky D, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2009) Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiology* **149**: 354-369.

Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana M, Poizat C, Zanetto A, Arús P, Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 127-138.

- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF** (2004) The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology* **14**: 1935-1940
- Doyle JJ** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Dreni L, Kater MM** (2014) MADS reloaded: evolution of the *AGAMOUS* subfamily genes. *New Phytologist* **201**: 717-732.
- Dreni L, Pilatone A, Yun D, Erreni S, Pajoro A, Caporali E, Zhang D, Kater MM** (2011) Functional analysis of all *AGAMOUS* subfamily members in rice reveals their roles in reproductive organ identity determination and meristem determinacy. *The Plant Cell* **23**: 2850-2863.
- Dreni L, Zhang D** (2016) Flower development: the evolutionary history and functions of the *AGL6* subfamily MADS-box genes. *Journal of experimental botany* **67**: 1625-1638.
- Duchesne AN** (1766) Histoire naturelle des fraisiers contenant les vues d'économie réunies à la botanique, et suivie de remarques particulières sur plusieurs points qui ont rapport à l'histoire naturelle générale, par M. Duchesne fils. chez Didot le jeune.
- Dugardeyn J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D** (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of experimental botany* **59**: 1-16.
- Durner EF** (1984) Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, Junebearing, and everbearing strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **109**: 396-400.

E

- El Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA** (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Reports* **15**: 642-646.

F

- Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, Dai N, Rogachev I, Nikiforova VJ, Fernie AR, Aharoni A** (2008) Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant physiology* **148**: 730-750.
- Federova N** (1946) Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria*. In *Compt Rend (Doklady) Acad Sci USSR*, Vol 52, pp 545-554.
- Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF** (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* **127**: 725-734.
- Folta KM, Davis TM** (2006) Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 399-415.

- Folta KM, Gardiner SE** (2009) Genetics and genomics of *Rosaceae*. Springer.
- Fornara F, Coupland G** (2009) Plant phase transitions make a SPLash. *Cell* **138**: 625-627.
- Foster T, Johnston R, Seleznova A** (2003) A morphological and quantitative characterization of early floral development in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Annals of Botany* **92**: 199-206.
- Freiman A, Shlizerman L, Golobovitch S, Yablovitz Z, Korchinsky R, Cohen Y, Samach A, Chevreau E, Le Roux P-M, Patocchi A** (2012) Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of *PcTFL1-1* and *PcTFL1-2*. *Planta* **235**: 1239-1251.
- Fu J, Qi S, Yang L, Dai Y, Dai S** (2014) Characterization of *chrysanthemum CISOC1-1* and *CISOC1-2*, homologous genes of *SOC1*. *Plant molecular biology reporter* **32**: 740-749.
- Fu J, Yang L, Dai S** (2015) Identification and characterization of the *CONSTANS-like* gene family in the short-day plant *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Molecular Genetics and Genomics* **290**: 1039-1054.

G

- Garcia A AF, Mollinari M, Marconi TG, Serang OR, Silva RR, Vieira ML, Vicentini R, Costa EA, Mancini MC, Garcia MO** (2013) SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. *Scientific reports* **3**.
- Garner WW, Allard HA** (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants.
- Gaston A, Perrotte J, Lerceteau-Köhler E, Rousseau-Gueutin M, Petit A, Hernould M, Rothan C, Denoyes B** (2013) *PFRU*, a single dominant *locus* regulates the balance between sexual and asexual plant reproduction in cultivated strawberry. *Journal of experimental botany* **64**: 1837-1848.
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C** (2001) The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* **107**: 525-535.
- Gil-Ariza DJ, Amaya I, López-Aranda JM, Sánchez-Sevilla JF, Botella MÁ, Valpuesta V** (2009) Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **134**: 337-347.
- González-Schain ND, Díaz-Mendoza M, Żurczak M, Suárez-López P** (2012) Potato *CONSTANS* is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *The Plant Journal* **70**: 678-690.
- Greb T, Mylne JS, Crevillen P, Geraldo N, An H, Gendall AR, Dean C** (2007) The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis* FLC. *Current biology* **17**: 73-78.

- Gregis V, Sessa A, Dorca-Fornell C, Kater MM** (2009) The *Arabidopsis* floral meristem identity genes *AP1*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes. *The Plant Journal* **60**: 626-637.
- Gregory F, Hussey G** (1953) Photoperiodic responses of *Arabidopsis thaliana*. In *Proceedings of the Linnean Society of London*, Vol 164. Wiley Online Library, pp 137-139.
- Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA** (2003) The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant physiology* **131**: 1855-1867.
- Grillo MA, Li C, Fowlkes AM, Briggeman TM, Zhou A, Schemske DW, Sang T** (2009) Genetic architecture for the adaptive origin of annual wild rice, *Oryza nivara*. *Evolution* **63**: 870-883.
- Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, Martienssen R** (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**: 1509-1517.
- Guttridge C, Thompson P** (1964) The effect of gibberellins on growth and flowering of *Fragaria* and *Duchesnea*. *Journal of Experimental Botany* **15**: 631-646.
- Guttridge CG** (1985) In: *CRC Handbook of Flowering*. CRC Press.

H

- Haldane J** (1919) The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* **8**: 299-309
- Han P, García-Ponce B, Fonseca-Salazar G, Alvarez-Buylla ER, Yu H** (2008) AGAMOUS-LIKE 17, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway. *The Plant Journal* **55**: 253-265.
- Hanano S, Goto K** (2011) *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell* **23**: 3172-3184.
- Hancock J, Luby J, Dale A, Callow P, Serce S, El-Shiek A** (2002) Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: Inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* **126**: 177-184.
- Hancock JF** (1999) *Strawberries*. CABI Pub.
- Hättasch C, Flachowsky H, Kapturska D, Hanke M-V** (2008) Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*). *Tree physiology* **28**: 1459-1466.
- Hayama R, Coupland G** (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology* **135**: 677-684.

- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K** (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**: 719-722.
- Haymes K, Davis T** (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of 'Alpine' *Fragaria vesca*, and transmission of transgenes to R1 progeny. *Plant Cell Reports* **17**: 279-283.
- Haymes K, Henken B, Davis T, Van de Weg W** (1997) Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf1) in the cultivated strawberry. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 1097-1101.
- He Y** (2009) Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Molecular Plant* **2**: 554-564.
- Heide O, Stavang J, Sønsteby A** (2013) Physiology and genetics of flowering in cultivated and wild strawberries—a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **88**: 1-18.
- Heide OM** (1977) Photoperiod and temperature interactions in growth and flowering of strawberry. *Physiologia Plantarum* **40**: 21-26.
- Heide OM, Sønsteby A** (2007) Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Physiologia Plantarum* **130**: 280-289.
- Helentjaris T** (1992) RFLP analyses for manipulating agronomic traits in plants.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J** (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* **72**: 761-769.
- Henschel K, Kofuji R, Hasebe M, Saedler H, Münster T, Theißen G** (2002) Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 801-814.
- Honjo M, Nunome T, Kataoka S, Yano T, Hamano M, Yamazaki H, Yamamoto T, Moroshita M, Yui S** (2016). Simple sequence repeat markers linked to the everbearing flowering gene in long-day and day-neutral cultivars of the octoploid cultivated strawberry *Fragaria × ananassa*. *Euphytica* **209(2)**: 291-303.
- Horvath A, Sánchez-Sevilla J, Punelli F, Richard L, Sesmero-Carrasco R, Leone A, Höefer M, Chartier P, Balsemin E, Barreneche T** (2011) Structured diversity in octoploid strawberry cultivars: importance of the old European germplasm. *Annals of Applied Biology* **159**: 358-371.
- Hsu C-Y, Adams JP, No K, Liang H, Meilan R, Pechanova O, Barakat A, Carlson JE, Page GP, Yuceer C** (2012) Overexpression of *CONSTANS* homologs *CO1* and *CO2* fails to alter normal reproductive onset and fall bud set in woody perennial poplar.
- Hsu WH, Yeh TJ, Huang KY, Li JY, Chen HY, Yang CH** (2014) *AGAMOUS-LIKE13*, a putative ancestor for the E functional genes, specifies male and female gametophyte morphogenesis. *The Plant Journal* **77**: 1-15.

- Hu Y, Liang W, Yin C, Yang X, Ping B, Li A, Jia R, Chen M, Luo Z, Cai Q** (2015) Interactions of OsMADS1 with floral homeotic genes in rice flower development. *Molecular plant* **8**: 1366-1384.
- Huang NC, Jane WN, Chen J, Yu TS** (2012) *Arabidopsis thaliana* CENTRORADIALIS homologue (ATC) acts systemically to inhibit floral initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **72**: 175-184.
- Huang X, Effgen S, Meyer RC, Theres K, Koornneef M** (2012) Epistatic natural allelic variation reveals a function of *AGAMOUS-LIKE6* in axillary bud formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 2364-2379.
- Hummer KE, Nathewet P, Yanagi T** (2009) Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae). *American journal of botany* **96**: 713-716.
- Hytönen T, Elomaa P** (2011) Genetic and environmental regulation of flowering and runnering in strawberry. *Genes, Genomes and Genomics* **5**: 56-64.
- Hytönen T, Elomaa P, Moritz T, Junttila O** (2009) Gibberellin mediates daylength-controlled differentiation of vegetative meristems in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *BMC plant biology* **9**: 18.
- Hytönen T, Mouhu K, Koivu I, Junttila O** (2008) Prohexadione-Calcium enhances the cropping potential and yield of strawberry. *European Journal of Horticultural Science*: 210-215.
- Hytönen T, Palonen P, Mouhu K, Junttila O** (2004) Crown branching and cropping potential in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) can be enhanced by daylength treatments. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **79**: 466-471.

I

- Iannetta PP, Laarhoven LJ, Medina-Escobar N, James EK, McManus MT, Davies HV, Harren FJ** (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum* **127**: 247-259.
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA** (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 293-297.
- Immink RG, Posé D, Ferrario S, Ott F, Kaufmann K, Valentim FL, De Folter S, Van der Wal F, van Dijk AD, Schmid M** (2012) Characterization of *SOC1*'s central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiology* **160**: 433-449.
- Isobe SN, Hirakawa H, Sato S, Maeda F, Ishikawa M, Mori T, Yamamoto Y, Shirasawa K, Kimura M, Fukami M** (2012) Construction of an integrated high density simple sequence repeat linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) and its applicability. *DNA research*: dss035.

Iwata H, Gaston A, Remay A, Thouroude T, Jeauffre J, Kawamura K, Oyant LHS, Araki T, Denoyes B, Foucher F (2012) The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *The Plant Journal* **69**: 116-125.

Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes & development* **16**: 2006-2020.

J

Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research* **29**: e25-e25.

Jack T, Brockman LL, Meyerowitz EM (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**: 683-697.

Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* **7**: 106-111.

Jang S, Torti S, Coupland G (2009) Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **60**: 614-625.

Jia H-F, Chai Y-M, Li C-L, Lu D, Luo J-J, Qin L, Shen Y-Y (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* **157**: 188-199.

Jones N, Ougham H, Thomas H (1997) Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* **137**: 165-177.

K

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*. *The Plant Cell* **25**: 1960-1978.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* **286**: 1962-1965.

Katahata S-I, Futamura N, Igasaki T, Shinohara K (2014) Functional analysis of *SOC1-like* and *AGL6-like* MADS-box genes of the gymnosperm *Cryptomeria japonica*. *Tree genetics & genomes* **10**: 317-327.

Kepiro J, Roose M (2010) AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree genetics & genomes* **6**: 1-11.

Kilian A, Wenzl P, Huttner E, Carling J, Xia L, Blois H, Caig V, Heller-Uszynska K, Jaccoud D, Hopper C (2012) Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. *Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols*: 67-89.

- Kim D-H, Doyle MR, Sung S, Amasino RM** (2009) Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental* **25**: 277-299.
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T** (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960-1962.
- Köhler C, Page DR, Gagliardini V, Grossniklaus U** (2005) The *Arabidopsis thaliana* MEDEA Polycomb group protein controls expression of *PHERES1* by parental imprinting. *Nature genetics* **37**: 28-30.
- Konsin M, Voipio I, Palonen P** (2001) Influence of photoperiod and duration of short-day treatment on vegetative growth and flowering of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **76**: 77-82.
- Koo SC, Bracko O, Park MS, Schwab R, Chun HJ, Park KM, Seo JS, Grbic V, Balasubramanian S, Schmid M** (2010) Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box gene *AGAMOUS-LIKE6*. *The Plant Journal* **62**: 807-816.
- Kosambi DD** (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* **12**: 172-175.
- Koskela EA, Mouhu K, Albani MC, Kurokura T, Rantanen M, Sargent DJ, Battey NH, Coupland G, Elomaa P, Hytönen T** (2012) Mutation in *TERMINAL FLOWER1* reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology* **159**: 1043-1054.
- Koskela EA, Sønsteby A, Flachowsky H, Heide OM, Hanke MV, Elomaa P, Hytönen T** (2016) *TERMINAL FLOWER1* is a breeding target for a novel everbearing trait and tailored flowering responses in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Plant biotechnology journal*.
- Kurokura T, Mimida N, Battey NH, Hytönen T** (2013) The regulation of seasonal flowering in the *Rosaceae*. *Journal of experimental botany* **64**: 4131-4141.

L

- Langmead B, Salzberg SL** (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* **9**: 357-359.
- Lee J, Lee I** (2010) Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2247-2254.
- Lee J, Oh M, Park H, Lee I** (2008) *SOC1* translocated to the nucleus by interaction with *AGL24* directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal* **55**: 832-843.
- Lee S, Kim J, Han JJ, Han MJ, An G** (2004) Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20)* ortholog in rice. *The Plant Journal* **38**: 754-764.

- Lei H-j, Yuan H-z, Liu Y, Guo X-w, Liao X, Liu L-l, Wang Q, Li T-h** (2013) Identification and characterization of *FaSOC1*, a homolog of *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* from strawberry. *Gene* **531**: 158-167.
- Lerceteau-Köhler E, Guerin G, Laigret F, Denoyes-Rothan B** (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and applied genetics* **107**: 619-628.
- Lerceteau-Köhler E, Moing A, Guérin G, Renaud C, Petit A, Rothan C, Denoyes B** (2012) Genetic dissection of fruit quality traits in the octoploid cultivated strawberry highlights the role of homoeo-QTL in their control. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 1059-1077.
- Li C, Dubcovsky J** (2008) Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. *The Plant Journal* **55**: 543-554.
- Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H** (2008) A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **15**: 110-120.
- Li H, Liang W, Hu Y, Zhu L, Yin C, Xu J, Dreni L, Kater MM, Zhang D** (2011) Rice *MADS6* interacts with the floral homeotic genes *SUPERWOMAN1*, *MADS3*, *MADS58*, *MADS13*, and *DROOPING LEAF* in specifying floral organ identities and meristem fate. *The Plant Cell* **23**: 2536-2552.
- Li H, Liang W, Jia R, Yin C, Zong J, Kong H, Zhang D** (2010) The *AGL6-like* gene *OsMADS6* regulates floral organ and meristem identities in rice. *Cell research* **20**: 299-313.
- 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.
- Liu B** (1998) *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC press
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H** (2009) Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental cell* **16**: 711-722.
- Liu J, Chen N, Chen F, Cai B, Dal Santo S, Tornielli GB, Pezzotti M, Cheng Z-MM** (2014) Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera*). *BMC genomics* **15**: 1.
- Liu L-J, Zhang Y-C, Li Q-H, Sang Y, Mao J, Lian H-L, Wang L, Yang H-Q** (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 292-306
- Liu T, Zhu S, Tang Q, Tang S** (2015) Identification of a *CONSTANS* homologous gene with distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *Gene* **560**: 63-70.
- López-Aranda J** (2008) The cultivation of strawberry in Huelva. *In*. The strawberry crop at Huelva Sevilla, Spain, pp 103-176.

López-Aranda J, Pliego-Alfaro E, López-Navidad I, Barceló-Muñoz M (1994) Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal of horticultural science* **69**: 625-637.

M

Manakasem Y, Goodwin P (2001) Responses of dayneutral and Junebearing strawberries to temperature and daylength. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **76**: 629-635.

Mandel M, Yanofsky MF (1998) The *Arabidopsis* *AGL9* MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sexual Plant Reproduction* **11**: 22-28.

Manning K (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical biochemistry* **195**: 45-50.

Martinez G, Chaves A, Anon M (1996) Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Journal of Plant Growth Regulation* **15**: 139-146.

Martínez-García JF, Virgós-Soler A, Prat S (2002) Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene *CONSTANS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 15211-15216.

Medina-Escobar N, Cárdenas J, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero J (1997) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical biochemistry* **248**: 288-296.

Medina-Minguez J (2008) Origin of the crop: a pioneer. *In*. The strawberry crop at Huelva Sevilla, Spain, pp 15-48.

Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beekman T (2008) Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics* **40**: 1489-1492.

Menzel G, Apel K, Melzer S (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *The Plant Journal* **9**: 399-408.

Merchante C, Vallarino JG, Osorio S, Aragüez I, Villarreal N, Ariza MT, Martínez GA, Medina-Escobar N, Civello MP, Fernie AR (2013) Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner. *Journal of experimental botany* **64**: 4421-4439.

Metzker ML (2010) Sequencing technologies — the next generation. *Nature reviews genetics* **11**: 31-46.

- Michaels SD** (2009) Flowering time regulation produces much fruit. *Current opinion in plant biology* **12**: 75-80.
- Michaels SD, Amasino RM** (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* **11**: 949-956.
- Michaels SD, Himmelblau E, Kim SY, Schomburg FM, Amasino RM** (2005) Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 149-156.
- Michemor R, Paran I, Kesseli R** (1991) Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 828-829.
- Mimida N, Ureshino A, Tanaka N, Shigeta N, Sato N, Moriya-Tanaka Y, Iwanami H, Honda C, Suzuki A, Komori S** (2011) Expression patterns of several floral genes during flower initiation in the apical buds of apple (*Malus domestica* Borkh.) revealed by in situ hybridization. *Plant cell reports* **30**: 1485-1492.
- Moens P, Sargent D, Cipriani G, Vilanova S, Gil-Ariza D, Arús P, Simpson D, Tobutt K, Monfort A** (2008) The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* **51**: 120-127.
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I** (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **35**: 613-623.
- Moon Y-H, Kang H-G, Jung J-Y, Jeon J-S, Sung S-K, An G** (1999) Determination of the motif responsible for interaction between the rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 family proteins using a yeast two-hybrid system. *Plant Physiology* **120**: 1193-1204.
- Moreno-Risueno MA, Van Norman JM, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN** (2010) Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* **329**: 1306-1311.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* **5**: 621-628.
- Mouhu K, Hytönen T, Folta K, Rantanen M, Paulin L, Auvinen P, Elomaa P** (2009) Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC plant biology* **9**: 122.
- Mouhu K, Kurokura T, Koskela EA, Albert VA, Elomaa P, Hytönen T** (2013) The *Fragaria vesca* homolog of *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* represses flowering and promotes vegetative growth. *The Plant Cell* **25**: 3296-3310.
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G** (2002) Control of flowering time interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* **14**: S111-S130.
- Mutasa-Göttgens E, Hedden P** (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*: erp040.

N

- Nakano Y, Higuchi Y, Yoshida Y, Hisamatsu T** (2015) Environmental responses of the *FT/TFL1* gene family and their involvement in flower induction in *Fragaria × ananassa*. *Journal of plant physiology* **177**: 60-66.
- Nemoto Y, Nonoue Y, Yano M, Izawa T** (2016) *Hd1*, a *CONSTANS* orthlog in rice, functions as an *Ehd1* repressor through interaction with monocot-specific CCT-domain protein Ghd7. *The Plant Journal*.
- Nicholas KB, Nicholas Jr HB** (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author **14**.
- Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP** (2008) Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiology* **146**: 333-350.
- Nitsch J** (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*: 211-215.
- Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R** (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**: 989-1003.
- Núñez JdV** (2008) Aspectos Economicos. *In*. The strawberry crop at Huelva Sevilla, Spain, pp 293-305.

O

- Ohmori S, Kimizu M, Sugita M, Miyao A, Hirochika H, Uchida E, Nagato Y, Yoshida H** (2009) *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6-like* MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *The Plant Cell* **21**: 3008-3025.
- Oosumi T, Gruszewski HA, Blischak LA, Baxter AJ, Wadl PA, Shuman JL, Veilleux RE, Shulaev V** (2006) High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta* **223**: 1219-1230.
- Opazo MC, Figueroa CR, Henríquez J, Herrera R, Bruno C, Valenzuela PD, Moya-León MA** (2010) Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant science* **179**: 479-488.

P

- Passmore S, Maine GT, Elble R, Christ C, Tye B-K** (1988) *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT α cells. *Journal of molecular biology* **204**: 593-606.
- Paterson AH** (1996) Genome mapping in plants. *In*. RG Landes Co.

- Perkins-Veazie P** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural reviews* **17**: 267-297.
- Perrotte J, Gaston A, Potier A, Petit A, Rothan C, Denoyes B** (2016) Narrowing down the single homoeologous *FaPFRU* locus controlling flowering in cultivated octoploid strawberry using a selective mapping strategy. *Plant biotechnology journal*.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45-e45.
- Porri A, Torti S, Romera-Branchat M, Coupland G** (2012) Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development* **139**: 2198-2209.
- Pritchard AE** (1949) California green house pests and their control. *California Agricultural Experimental Station Bulletin*. **713**: 1-71.
- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G** (1995) The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-857.

R

- Randoux M, Davière JM, Jeauffre J, Thouroude T, Pierre S, Toualbia Y, Perrotte J, Reynoird JP, Jammes MJ, Oyant HS** (2014) RoKSN, a floral repressor, forms protein complexes with RoFD and RoFT to regulate vegetative and reproductive development in rose. *New phytologist* **202**: 161-173.
- Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Juchaux M, Sakr S, Foucher F** (2012) Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, *RoKSN*, a rose *TFL1* homologue. *Journal of experimental botany* **63**: 6543-6554.
- Rantanen M, Kurokura T, Jiang P, Mouhu K, Hytönen T** (2015) Strawberry homologue of *TERMINAL FLOWER1* integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering. *The Plant Journal* **82**: 163-173.
- Rantanen M, Kurokura T, Mouhu K, Pinho P, Tetri E, Halonen L, Palonen P, Elomaa P, Hytönen T** (2014) Light quality regulates flowering in FvFT1/FvTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in plant science* **5**.
- Rijkema AS, Zethof J, Gerats T, Vandenbussche M** (2009) The petunia *AGL6* gene has a *SEPALLATA-like* function in floral patterning. *The Plant Journal* **60**: 1-9.
- Robson F, Costa MMR, Hepworth SR, Vizir I, Reeves PH, Putterill J, Coupland G** (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *The Plant Journal* **28**: 619-631.
- Rodríguez-Falcón M, Bou J, Prat S** (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 151-180.

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

Rousseau-Gueutin M, Lerceteau-Köhler E, Barrot L, Sargent DJ, Monfort A, Simpson D, Arús P, Guérin G, Denoyes-Rothan B (2008) Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* **179**: 2045-2060.

S

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**: 406-425.

Salvatierra A, Pimentel P, Moya-Leon MA, Caligari PD, Herrera R (2010) Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Phytochemistry* **71**: 1839-1847.

Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G (2000) Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-1616.

Sánchez-Sevilla JF, Horvath A, Botella MA, Gaston A, Folta K, Kilian A, Denoyes B, Amaya I (2015) Diversity Arrays Technology (DArT) marker platforms for diversity analysis and linkage mapping in a complex crop, the octoploid cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *PloS one* **10**: e0144960.

Sargent D, Clarke J, Simpson D, Tobutt K, Arus P, Monfort A, Vilanova S, Denoyes-Rothan B, Rousseau M, Folta K (2006) An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1349-1359.

Sargent D, Davis T, Tobutt K, Wilkinson M, Battey N, Simpson D (2004) A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1385-1391.

Sargent D, Fernández-Fernández F, Ruiz-Roja J, Sutherland B, Passey A, Whitehouse A, Simpson D (2009) A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Molecular Breeding* **24**: 293-303.

Savini G, Giorgi V, Scarano E, Neri D (2008) Strawberry plant relationship through the stolon. *Physiologia plantarum* **134**: 421-429.

Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**: 261-265.

- Schauer SE, Schlüter PM, Baskar R, Gheyselinck J, Bolaños A, Curtis MD, Grossniklaus U** (2009) Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of *AGAMOUS-LIKE6* subfamily members in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**: 987-1000.
- Schouten HJ, van de Weg WE, Carling J, Khan SA, McKay SJ, van Kaauwen MP, Wittenberg AH, Koehorst-van Putten HJ, Noordijk Y, Gao Z** (2012) Diversity arrays technology (DART) markers in apple for genetic linkage maps. *Molecular Breeding* **29**: 645-660.
- Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H** (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**: 931.
- Schwechheimer C** (2008) Understanding gibberellic acid signaling—are we there yet? *Current opinion in plant biology* **11**: 9-15.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G** (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**: 898-912.
- Seeram NP** (2008) Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**: 627-629.
- Semeniuk P** (1971) Inheritance of recurrent blooming in *Rosa wichuraiana*. *Journal of Heredity* **62**: 203-204
- Senanayake Y, Bringham R** (1967) Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. *American Journal of Botany*: 221-228.
- Serçe S, Hancock JF** (2005) The temperature and photoperiod regulation of flowering and runnering in the strawberries, *Fragaria chiloensis*, *F. virginiana*, and *F. × ananassa*. *Scientia horticulturae* **103**: 167-177.
- Shaw DV, Famula TR** (2005) Complex segregation analysis of day-neutrality in domestic strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Euphytica* **145**: 331-338.
- Shindo C, Aranzana MJ, Lister C, Baxter C, Nicholls C, Nordborg M, Dean C** (2005) Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **138**: 1163-1173.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics* **43**: 109-116.
- Simpson D, Sharp D** (1988) The inheritance of fruit yield and stolon production in everbearing strawberries. *Euphytica* **38**: 65-74.
- Singh B, Singh AK** (2015) *Marker-assisted plant breeding: principles and practices*. Springer.

- Slovin JP, Schmitt K, Folta KM** (2009) An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the *Rosaceae*. *Plant Methods* **5**: 15.
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K** (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**: 3081-3098.
- Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T** (2015) Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annual review of plant biology* **66**: 441-464.
- Sonsteby A, Heide O** (2008) Long-day rather than autonomous control of flowering in the diploid everbearing strawberry *Fragaria vesca* ssp. *semperflorens*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **83**: 360-366.
- Sonsteby A, Nes A** (1998) Short days and temperature effects of growth and flowering in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Journal of horticultural science & biotechnology*.
- Sooriyapathirana SS, Mookerjee S, Weebadde CK, Finn CE, Lewers K, Bushakra JM, Luby JJ, Stewart P, Hancock JF** (2015) Identification of QTL associated with flower and runner production in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Journal of Berry Research*: 1-10.
- Spiller M, Linde M, Hibrand-Saint Oyant L, Tsai C, Byrne D, Smulders M, Foucher F, Debener T** (2011) Towards a unified genetic map for diploid roses. *Theoretical and applied genetics* **122**: 489-500.
- Sreekantan L, Thomas MR** (2006) *VvFT* and *VvMADS8*, the grapevine homologues of the floral integrators *FT* and *SOC1*, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology* **33**: 1129-1139.
- Staudt G** (1989) The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Acta Hort* **265**: 23-33.
- Staudt G** (2008) Strawberry biogeography, genetics and systematics. *In VI International Strawberry Symposium* 842, pp 71-84.
- Stewart PJ, Folta KM** (2010) A review of photoperiodic flowering research in strawberry (*Fragaria* spp.). *Critical reviews in plant science* **29**: 1-13.
- Strand LL** (2008) Integrated pest management for strawberries, Vol 3351. UCANR Publications.
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G** (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116-1120
- Sun T-p** (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA–GID1–DELLA signaling module in plants. *Current Biology* **21**: R338-R345.

Sung S, Amasino RM (2004) Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159-164.

Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, Nakahigashi K, Goto K, Jacobsen SE, Amasino RM (2006) Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nature genetics* **38**: 706-710.

Sung S-K, Yu G-H, An G (1999) Characterization of *MdMADS2*, a member of the SQUAMOSA subfamily of genes, in Apple. *Plant Physiology* **120**: 969-978.

Sussmilch FC, Berbel A, Hecht V, Vander Schoor JK, Ferrándiz C, Madueño F, Weller JL (2015) Pea *VEGETATIVE2* is an *FD* homolog that is essential for flowering and compound inflorescence Development. *The Plant Cell* **27**: 1046-1060.

Symons G, Chua Y-J, Ross J, Quittenden L, Davies N, Reid J (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of experimental botany* **63**: 4741-4750.

T

Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**: 1033-1036.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**: 2731-2739.

Tani E, Polidoros AN, Flemetakis E, Stedel C, Kalloniati C, Demetriou K, Katinakis P, Tsaftaris AS (2009) Characterization and expression analysis of *AGAMOUS-like*, *SEEDSTICK-like*, and *SEPALLATA-like* MADS-box genes in peach (*Prunus persica*) fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 690-700.

Tao Z, Shen L, Liu C, Liu L, Yan Y, Yu H (2012) Genome-wide identification of *SOC1* and *SVP* targets during the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **70**: 549-561.

Taoka K-i, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, Yamaguchi M, Nakashima C, Purwestri YA, Tamaki S (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**: 332-335.

Taoka K-i, Ohki I, Tsuji H, Kojima C, Shimamoto K (2013) Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends in plant science* **18**: 287-294.

Tapia-López R, García-Ponce B, Dubrovsky JG, Garay-Arroyo A, Pérez-Ruiz RV, Kim S-H, Acevedo F, Pelaz S, Alvarez-Buylla ER (2008) An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1 (AGL12)*, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **146**: 1182-1192.

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research* **17**: 6463-6471.

- Taylor D, Blake P, Browning G** (1994) Identification of gibberellins in leaf tissues of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) grown under different photoperiods. *Plant growth regulation* **15**: 235-240.
- Tenessen JA, Govindarajulu R, Ashman T-L, Liston A** (2014) Evolutionary origins and dynamics of octoploid strawberry subgenomes revealed by dense targeted capture linkage maps. *Genome biology and evolution* **6**: 3295-3313.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* **37**: 914-939.
- Thomas B, Vince-Prue D** (1996) *Photoperiodism in plants*. Academic Press.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**: 4673-4680.
- Tinker NA, Kilian A, Wight CP, Heller-Uszynska K, Wenzl P, Rines HW, Bjørnstad Å, Howarth CJ, Jannink J-L, Anderson JM** (2009) New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BMC genomics* **10**: 1.
- Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C** (2010) The flowering time regulator *CONSTANS* is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* **187**: 57-66.
- Tooke F, Ordidge M, Chiurugwi T, Battey N** (2005) Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2587-2599.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J** (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research* **10**: 967-981.
- Trainin T, Bar-Ya'akov I, Holland D** (2013) *ParSOC1*, a MADS-box gene closely related to *Arabidopsis AGL20/SOC1*, is expressed in apricot leaves in a diurnal manner and is linked with chilling requirements for dormancy break. *Tree genetics & genomes* **9**: 753-766.
- Troggio M, Šurbanovski N, Bianco L, Moretto M, Giongo L, Banchi E, Viola R, Fernández FF, Costa F, Velasco R** (2013) Evaluation of SNP data from the *Malus* Infinium array identifies challenges for genetic analysis of complex genomes of polyploid origin. *PLoS one* **8**: e67407.
- Tsuji H, Nakamura H, Taoka K-i, Shimamoto K** (2013) Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes. *Plant and Cell Physiology* **54**: 385-397.
- Turck F, Fornara F, Coupland G** (2008) Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 573-594.

Tyrka M, Dziadczyk P, Hortyński JA (2002) Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. *Euphytica* **125**: 273-280.

U

Ubi BE, Saito T, Bai S, Nishitani C, Ban Y, Ikeda K, Ito A, Moriguchi T (2013) Characterization of 10 MADS-box genes from *Pyrus pyrifolia* and their differential expression during fruit development and ripening. *Gene* **528**: 183-194.

V

Vallarino JG, Osorio S, Bombarely A, Casañal A, Cruz-Rus E, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I, Giavalisco P, Fernie AR, Botella MA (2015) Central role of *FaGAMYB* in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytologist* **208**: 482-496.

Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-1006.

Van der Beek J, Pet G, Lindhout P (1994) Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 467-473.

Van Dijk T, Pagliarani G, Pikunova A, Noordijk Y, Yilmaz-Temel H, Meulenbroek B, Visser RG, van de Weg E (2014) Genomic rearrangements and signatures of breeding in the allo-octoploid strawberry as revealed through an allele dose based SSR linkage map. *BMC plant biology* **14**: 1.

Van Engelen FA, Molthoff JW, Conner AJ, Nap J-P, Pereira A, Stiekema WJ (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic research* **4**: 288-290.

Van Ooijen J (2006) JoinMap[®] 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. *Kyazma BV, Wageningen* **33**.

Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, Gerats T (2003) Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Research* **31**: 4401-4409.

Varkonyi-Gasic E, Moss S, Voogd C, Wang T, Putterill J, Hellens RP (2013) Homologs of *FT*, *CEN* and *FD* respond to developmental and environmental signals affecting growth and flowering in the perennial vine *kiwifruit*. *New Phytologist* **198**: 732-746.

Verheul MJ, Sønsteby A, Grimstad SO (2007) Influences of day and night temperatures on flowering of *Fragaria × ananassa* Duch., cvs. Korona and Elsanta, at different photoperiods. *Scientia horticulturnae* **112**: 200-206.

- Viaene T, Vekemans D, Becker A, Melzer S, Geuten K** (2010) Expression divergence of the AGL6 MADS domain transcription factor lineage after a core eudicot duplication suggests functional diversification. *BMC plant biology* **10**: 148.
- Viruel M, Sánchez D, Arús P** (2002) An SSR and RFLP linkage map for the octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). In Plant, Animal and Microbe genomes X conference.
- Voogd C, Wang T, Varkonyi-Gasic E** (2015) Functional and expression analyses of *kiwifruit* *SOC1*-like genes suggest that they may not have a role in the transition to flowering but may affect the duration of dormancy. *Journal of experimental botany* **66**: 4699-4710.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* **23**: 4407-4414.

W

- Wang J, Zhou J, Zhang B, Vanitha J, Ramachandran S, Jiang SY** (2011) Genome-wide expansion and expression divergence of the basic leucine zipper transcription factors in higher plants with an emphasis on sorghum F. *Journal of integrative plant biology* **53**: 212-231.
- Wang S, Beruto M, Xue J, Zhu F, Liu C, Yan Y, Zhang X** (2015) Molecular cloning and potential function prediction of homologous *SOC1* genes in tree peony. *Plant cell reports*: 1-13.
- Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang BE, Maccaferri M, Salvi S, Milner SG, Cattivelli L** (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal* **12**: 787-796.
- Weebadde C, Wang D, Finn C, Lewers K, Luby J, Bushakra J, Sjulín T, Hancock J** (2008) Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. *Plant Breeding* **127**: 94-101.
- Wei K, Chen J, Wang Y, Chen Y, Chen S, Lin Y, Pan S, Zhong X, Xie D** (2012) Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. *DNA research* **19**: 463-476.
- Weiss D, Ori N** (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant physiology* **144**: 1240-1246.
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A** (2004) Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9915-9920.
- Wickland DP, Hanzawa Y** (2015) The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms. *Molecular plant* **8**: 983-997.

- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056-1059.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* **18**: 6531-6535.
- Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR** (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* **100**: 403-408.
- Winter P, Kahl G** (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 438-448.
- Wiseman NJ, Turnbull CG** (1999a) Effects of photoperiod and paclobutrazol on growth dynamics of petioles in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Functional Plant Biology* **26**: 353-358.
- Wiseman NJ, Turnbull CG** (1999b) Endogenous gibberellin content does not correlate with photoperiod-induced growth changes in strawberry petioles. *Functional Plant Biology* **26**: 359-366.
- Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES, Helliwell CA** (2006) The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 14631-14636.
- Wu F, Price BW, Haider W, Seufferheld G, Nelson R, Hanzawa Y** (2014) Functional and evolutionary characterization of the *CONSTANS* gene family in short-day photoperiodic flowering in *soybean*. *PLoS One* **9**: e85754.

Y

- Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T** (2005) *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1175-1189.
- Yamaguchi A, Wu M-F, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D** (2009) The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental cell* **17**: 268-278.
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225-251.
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y** (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *The Plant Cell* **12**: 2473-2483.

- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990)** The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35-39.
- Yao J-L, Dong Y-H, Kvarnheden A, Morris B (1999)** Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**: 8-13.
- Yoo SJ, Chung KS, Jung SH, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH (2010)** *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* has *TFL1*-like activity and functions redundantly with *TFL1* in inflorescence meristem development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**: 241-253.
- Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH (2005)** *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 770-778.
- Yoo SK, Hong SM, Lee JS, Ahn JH (2011b)** A genetic screen for leaf movement mutants identifies a potential role for *AGAMOUS-LIKE 6 (AGL6)* in circadian-clock control. *Molecules and cells* **31**: 281-287.
- Yoo SK, Wu X, Lee JS, Ahn JH (2011a)** *AGAMOUS-LIKE 6* is a floral promoter that negatively regulates the *FLC/MAF* clade genes and positively regulates *FT* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **65**: 62-76.
- Yoo SY, Kardailsky I, Lee JS, Weigel D, Ahn JH (2004)** Acceleration of Flowering by Overexpression of *MFT (MOTHER OF FT AND TFL1)*. *Molecules & Cells* **17**.
- Yu D, Hu Y, Wang H, Pan J, Li Y, Lou D (2016)** The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering. *Plant Physiology*: pp. 00891.02016.
- Yuceer C, Harkess RL, Land SB, Luthe DS (2002)** Structure and developmental regulation of *CONSTANS-LIKE* genes isolated from *Populus deltoides*. *Plant Science* **163**: 615-625.

Z

- Zahn LM, Kong H, Leebens-Mack JH, Kim S, Soltis PS, Landherr LL, Soltis DE, Ma H (2005)** The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics* **169**: 2209-2223.
- Zhang X, An L, Nguyen TH, Liang H, Wang R, Liu X, Li T, Qi Y, Yu F (2015)** The cloning and functional characterization of Peach *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* homologous genes *PpCO* and *PpFT*.
- Zhou C-M, Zhang T-Q, Wang X, Yu S, Lian H, Tang H, Feng Z-Y, Zozomova-Lihová J, Wang J-W (2013)** Molecular basis of age-dependent vernalization in *Cardamine flexuosa*. *Science* **340**: 1097-1100.

- Zorrilla-Fontanesi Y, Cabeza A, Domínguez P, Medina JJ, Valpuesta V, Denoyes-Rothan B, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I** (2011b) Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Theoretical and applied genetics* **123**: 755-778.
- Zorrilla-Fontanesi Y, Cabeza A, Torres AM, Botella MA, Valpuesta V, Monfort A, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I** (2011a) Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the *Rosoideae* subfamily. *Molecular Breeding* **27**: 137-156.
- Zorrilla-Fontanesi Y, Rambla J-L, Cabeza A, Medina JJ, Sánchez-Sevilla JF, Valpuesta V, Botella MA, Granell A, Amaya I** (2012) Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase *FaOMT* as the *locus* controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiology* **159**: 851.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Apéndice



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Apéndice

1. Número de acceso de las secuencias utilizadas.

Tabla S1. Listado de números de acceso de las secuencias usadas en la caracterización de *FaCO*.

Nombre del gen	Número de acceso	Grupo/Subfamilia	Base de datos
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>AtCO</i>	AT5G15840	Group 1	TAIR
<i>AtCOL1</i>	AT5G15850	Group 1	TAIR
<i>AtCOL10</i>	AT5G48250	Group 3	TAIR
<i>AtCOL11</i>	AT4G15250	Group 3	TAIR
<i>AtCOL12</i>	AT3G21880	Group 3	TAIR
<i>AtCOL13</i>	AT2G47890	Group 3	TAIR
<i>AtCOL14</i>	AT2G33500	Group 3	TAIR
<i>AtCOL15</i>	AT1G28050	Group 3	TAIR
<i>AtCOL16</i>	AT1G25440	Group 2	TAIR
<i>AtCOL2</i>	AT3G02380	Group 1	TAIR
<i>AtCOL3</i>	AT2G24790	Group 1	TAIR
<i>AtCOL4</i>	AT5G24930	Group 1	TAIR
<i>AtCOL5</i>	AT5G57660	Group 1	TAIR
<i>AtCOL6</i>	AT1G68520	Group 2	TAIR
<i>AtCOL7</i>	AT1G73870	Group 2	TAIR
<i>AtCOL8</i>	AT1G49130	Group 2	TAIR
<i>AtCOL9</i>	AT3G07650	Group 3	TAIR
<i>ATSTO</i>	AT1G06040	Outgroup	TAIR
<i>Vitis vinifera</i>			
<i>VvCO</i>	CU459226	Group 1	NCBI
<i>Populus deltoides</i>			
<i>PdCO1</i>	AY515150	Group 1	NCBI
<i>PdCO2</i>	AY515151	Group 1	NCBI
<i>Solanum tuberosum</i>			
<i>StCOL</i>	DQ882684	Group 1	NCBI
<i>Oriza sativa</i>			
<i>OsHd1</i>	AB041840	Group 1	NCBI
<i>Malus domestica</i>			
<i>Md271388</i>	MDP0000271388	Group 2	GDR
<i>Md294359</i>	MDP0000294359	Group 1	GDR
<i>MdCOL1</i>	AF052584	Group 1	NCBI
<i>MdCOL2</i>	AF052585	Group 1	NCBI
<i>Prunus persica</i>			
<i>Ppe004756</i>	scaffold_1:22,447,084..22,450,267	Group 3	GDR
<i>Ppe006893</i>	scaffold_8:20,983,651..20,985,809	Group 3	GDR
<i>Ppe007007</i>	scaffold_3:18,343,282..18,345,905	Group 1	GDR
<i>Ppe007083</i>	scaffold_1:6,788,512..6,789,796	Group 1	GDR
<i>Ppe008143</i>	scaffold_1:34,301,935..34,303,374	Group 1	GDR
<i>Ppe025622</i>	scaffold_3:16,815,877..16,818,464	Group 3	GDR
<i>PpeCO</i>	EU939303	Group 1	NCBI
<i>Fragaria vesca</i>			
<i>Fv03742-v1.0-hybrid</i>	LG4:25,261,565..25,263,037	Group 2	GDR
<i>Fv04172-v1.0-hybrid</i>	LG6:32,402,376..32,406,182	Group 1	GDR

Nombre del gen	Número de acceso	Grupo/Subfamilia	Base de datos
<i>Fv14981-v1.0-hybrid</i>	LG2:21,498,418..21,499,437	Group 1	GDR
<i>Fv15552-v1.0-hybrid</i>	LG6:15,473,864..15,476,231	Group 3	GDR
<i>Fv25171-v1.0-hybrid</i>	LG5:6,651,756..6,653,481	Group 2	GDR
<i>Fv27383-v1.0-hybrid</i>	LG4:10,584,825..10,586,015	Group 1	GDR
<i>Fragaria × ananassa</i>			
<i>FaCO-2</i>	JQ663599	Group 1	NCBI
<i>FaCOcamarosa</i>	FJ377616	Group 1	NCBI
<i>FaCOselva</i>	Clonado	Group 1	

Tabla S2. Listado de números de acceso de las secuencias usadas en la caracterización de *FaFD2*.

Nombre del gen	Numero de acceso	Base de datos
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
<i>AtABF1</i>	AT1G49720	TAIR
<i>AtABF3</i>	AT4G34000	TAIR
<i>AtABI5</i>	AT2G36270	TAIR
<i>AtAREB3</i>	AT3G56850	TAIR
<i>AtBGF4</i>	AT1G03970	TAIR
<i>AtBZIP13</i>	AT5G44080	TAIR
<i>AtBZIP15</i>	AT5G42910	TAIR
<i>AtDPBF2</i>	AT3G44460	TAIR
<i>AtDPBF4</i>	AT2G41070	TAIR
<i>AtFD</i>	AT4G35900	TAIR
<i>AtFDP</i>	AT2G17770	TAIR
<i>Vitis vinifera</i>		
<i>VvFD-like</i>	XM_003635211	NCBI
<i>Populus trichocarpa</i>		
<i>PtFD</i>	XM_002307706	NCBI
<i>Solanum lycopersicum</i>		
<i>SISPGB</i>	NM_001247416	NCBI
<i>Oriza sativa</i>		
<i>OsFD</i>	NM_001051133	NCBI
<i>Malus domestica</i>		
<i>Md169473</i>	MDP0000169473	GDR
<i>MdBZIP15</i>	HM122467	NCBI
<i>MdZIP1</i>	AY786307	NCBI
<i>Prunus pérsica</i>		
<i>Pp018386</i>	scaffold_7: 17775387 - 17776540	GDR
<i>Fragaria vesca</i>		
<i>FvFD-Hawaii</i>	EX675574	NCBI
<i>Fv08566-v1.0-Hybrid</i>	LG2: 19140765 - 19141612	GDR
<i>Fv11837-v1.0-Hybrid</i>	LG5: 21649533 - 21651655	GDR
<i>Fv14556-v1.0-Hybrid</i>	LG1: 7619838 - 7620746	GDR
<i>Fragaria × ananassa</i>		
<i>FaFD2</i>	Clonado	
<i>Triticum aestivicum</i>		
<i>TaFDL6</i>	EU307114	NCBI

Tabla S3. Listado de números de acceso de las secuencias usadas en la caracterización de *FaSOC1* y *FaFD2*.

Nombre del Gen	Numero de acceso	Grupo/Subfamilia	Base de datos
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>AtAG</i>	AT4G18960	MICK ^C /AG	TAIR
<i>AtAGL12/XAL1</i>	AT1G71692	MICK ^C /AG	TAIR
<i>AtAGL13</i>	AT3G61120	MICK ^C /AGL6	TAIR
<i>AtAGL14/XAL2</i>	AT4G11880	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtAGL15</i>	AT5G13790	MICK ^C /AGL15	TAIR
<i>AtAGL16</i>	AT3G57230	MICK ^C /AGL17	TAIR
<i>AtAGL17</i>	AT2G22630	MICK ^C /AGL17	TAIR
<i>AtAGL18</i>	AT3G57390	MICK ^C /AGL15	TAIR
<i>AtAGL19</i>	AT4G22950	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtAGL21</i>	AT4G37940	MICK ^C /AGL17	TAIR
<i>AtAGL24</i>	AT4G24540	MICK ^C /SVP	TAIR
<i>AtAGL42/FYF</i>	AT5G62165	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtAGL6</i>	AT2G45650	MICK ^C /AGL6	TAIR
<i>AtAGL71</i>	AT5G51870	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtAGL72</i>	AT5G51860	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtAGL79</i>	AT3G30260	MICK ^C /SQUA	TAIR
<i>AtAGL8/FUL</i>	AT5G60910	MICK ^C /SQUA	TAIR
<i>AtAGL94</i>	AT1G69540	MICK [*] /outgroup	TAIR
<i>AtANR1</i>	AT2G14210	MICK ^C /AGL17	TAIR
<i>AtAP1</i>	AT1G69120	MICK ^C /DEF	TAIR
<i>AtAP3</i>	AT3G54340	MICK ^C /DEF	TAIR
<i>AtFLC</i>	AT5G10140	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtMAF1</i>	AT1G77080	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtMAF2</i>	AT5G65050	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtMAF3</i>	AT5G65060	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtMAF4</i>	AT5G65070	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtMAF5</i>	AT5G65080	MICK ^C /FLC	TAIR
<i>AtPI</i>	AT5G20240	MICK ^C /GLO	TAIR
<i>AtSEP1</i>	AT5G15800	MICK ^C /SEP	TAIR
<i>AtSEP2</i>	AT2G03710	MICK ^C /SEP	TAIR
<i>AtSEP3</i>	AT1G24260	MICK ^C /SEP	TAIR
<i>AtSEP4</i>	AT3G02310	MICK ^C /SEP	TAIR
<i>AtSHP1</i>	AT3G58780	MICK ^C /AG	TAIR
<i>AtSHP2</i>	AT2G42830	MICK ^C /AG	TAIR
<i>AtSOC1</i>	AT2G54660	MICK ^C /SOC1	TAIR
<i>AtSTK</i>	AT4G09960	MICK ^C /AG	TAIR
<i>AtSVP</i>	AT2G22540	MICK ^C /SVP	TAIR
<i>Vitis vinifera</i>			
<i>VvAG1/MADS1</i>	AF265562	MICK ^C /AG	NCBI
<i>VvAG3/MADS5</i>	AF373604	MICK ^C /AG	NCBI
<i>VvAGL6/MADS3</i>	AF373602	MICK ^C /AGL6	NCBI
<i>VvAGL15</i>	XM_010660912	MICK ^C /AGL15	NCBI
<i>VvAP1</i>	AY538746	MICK ^C /SQUA	NCBI
<i>VvAP3.1</i>	EF418603	MICK ^C /DEF	NCBI
<i>VvAP3.2</i>	DQ9793341	MICK ^C /DEF	NCBI
<i>VvFUL-like</i>	AY538747	MICK ^C /SQUA	NCBI
<i>VvPI/MADS9</i>	DQ059750	MICK ^C /GLO	NCBI
<i>VvSEP1/MADS2</i>	AF373601	MICK ^C /SEP	NCBI

Nombre del Gen	Numero de acceso	Grupo/Subfamilia	Base de datos
<i>VvSEP3/MADS4</i>	AF373603	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>VvSOC1/MADS8</i>	DQ504309	MICK ^C /SOC1	NCBI
<i>Malus domestica</i>			
<i>MdAGL6/MADS11</i>	AJ000763	MICK ^C /AGL6	NCBI
<i>MdMADS1</i>	U78947	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>MdMADS2</i>	U78948	MICK ^C /SQUA	NCBI
<i>MdMADS3</i>	U78949	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>MdMADS4</i>	U78950	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>MdMADS5</i>	AJ000759	MICK ^C /SQUA	NCBI
<i>MdMADS8</i>	AJ001681	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>MdSOC1a</i>	AB501124	MICK ^C /SOC1	NCBI
<i>MdSOC1b</i>	AB501125	MICK ^C /SOC1	NCBI
<i>MdSOC1c</i>	GU983664	MICK ^C /SOC1	NCBI
<i>Prunus pérsica</i>			
<i>Ppa010391m</i>	scaffold_5: 16626294 - 16630676	MICK ^C /SEP	Phytozone
<i>Ppa010548m</i>	scaffold_3: 18619188 - 18623759	MICK ^C /SEP	Phytozone
<i>Ppa010679m</i>	scaffold_1: 22775404 - 22780228	MICK ^C /SEP	Phytozone
<i>Ppa010714m</i>	scaffold_1: 46335147 - 46342262	MICK ^C /SVP	Phytozone
<i>Ppa010723m</i>	scaffold_1: 27954795 - 27957462	MICK ^C /SQUA	Phytozone
<i>Ppa011063m</i>	scaffold_6: 18701564 - 18704722	MICK ^C /SVP	Phytozone
<i>Ppa011123m</i>	scaffold_1: 46353152 - 46360953	MICK ^C /SVP	Phytozone
<i>Ppa019932m</i>	scaffold_2: 17015682 - 17019461	MICK ^C /AGL6	Phytozone
<i>Ppa1027139m</i>	scaffold_1: 27947267 - 27950584	MICK ^C /SEP	Phytozone
<i>PpaMADS2</i>	DQ102369	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>PpaMADS7</i>	EF440352	MICK ^C /SEP	NCBI
<i>Prunus mume</i>			
<i>PmAGL6</i>	XM_008234609	MICK ^C /AGL6	NCBI
<i>Fragaria vesca</i>			
<i>FvGene04228-v1.0-hybrid</i>	LG6: 32701767 - 32706464	MICK ^C /SQUA	GDR
<i>FvGene04229-v1.0-hybrid</i>	LG6: 32713572 - 32717121	MICK ^C /SEP	GDR
<i>FvGene04562-v1.0-hybrid</i>	LG4: 26497226 - 26500156	MICK ^C /SQUA	GDR
<i>FvGene04563-v1.0-hybrid</i>	unanchored: 2372350.-.2377656	MICK ^C /SEP	GDR
<i>FvGene12119-v1.0-hybrid</i>	LG5: 24719403 - 24730199	MICK ^C /SVP	GDR
<i>FvGene13354-v1.0-hybrid</i>	LG7: 22117084 - 22120755	MICK ^C /SOC1	GDR
<i>FvGene14896-v1.0-hybrid</i>	LG1: 9126558.-.9128318	MICK ^C /DEF	GDR
<i>FvGene19425-v1.0-hybrid</i>	LG7: 4380104 - 4385219	MICK ^C /SOC1	GDR
<i>FvGene19428-v1.0-hybrid</i>	LG7: 4394291 - 4400128	MICK ^C /AGL6	GDR
<i>FvGene20134-v1.0-hybrid</i>	LG3: 8329328 - 8335488	MICK ^C /SQUA	GDR
<i>FvGene20808-v1.0-hybrid</i>	unanchored: 2475365 - 2479324	MICK ^C /SVP	GDR
<i>FvGene22696-v1.0-hybrid</i>	LG1: 21966526.-.21971070	MICK ^C /AGL17	GDR
<i>FvGene24494-v1.0-hybrid</i>	LG6: 29313839 - 29322712	MICK ^C /AG	GDR
<i>FvGene24852-v1.0-hybrid</i>	LG3: 4452995.-.4457793	MICK ^C /AG	GDR
<i>FvGene25070-v1.0-hybrid</i>	LG3: 11745926 - 11750386	MICK ^C /AG	GDR
<i>FvGene25618-v1.0-hybrid</i>	LG2: 4820918.-.4823220	MICK ^C /AGL15	GDR
<i>FvGene25669-v1.0-hybrid</i>	LG5: 16342806.-.16343483	MICK ^C /FLC	GDR
<i>FvGene26118-v1.0-hybrid</i>	LG5: 7910922 - 7917292	MICK ^C /SEP	GDR
<i>FvGene26119-v1.0-hybrid</i>	LG5: 7921634 - 7925179	MICK ^C /SQUA	GDR
<i>FvGene26432-v1.0-hybrid</i>	LG1: 4044300 - 4049969	MICK ^C /AGL17	GDR
<i>FvGene31068-v1.0-hybrid</i>	LG1: 3102970.-.3103605	MICK ^C /FLC	GDR
<i>FvSOC1a</i>	FJ531999	MICK ^C /SOC1	NCBI
<i>FvSOC1b</i>	JF806634	MICK ^C /SOC1	NCBI

Nombre del Gen	Numero de acceso	Grupo/Subfamilia	Base de datos
<i>Fragaria × ananassa</i>			
<i>FaAGL6</i>	Clonado	MICK ^c /AGL6	
<i>FaSOC1</i>	Clonado	MICK ^c /SOC1	
<i>Prunus armeniaca</i>			
<i>ParSOC1</i>	FJ472817	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Populus trichocarpa</i>			
<i>PtPTM5/SOC1</i>	AF377868	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>PtAGL6</i>	PAC:27034222	MICK ^c /AGL6	Phytozone
<i>Triticum aestivum</i>			
<i>TaSOC1</i>	AB281427	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Zea mays</i>			
<i>ZmMADS1</i>	AF112148	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Oriza sativa</i>			
<i>OsSOC1</i>	AY332476	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Glicine max</i>			
<i>GmSOC1</i>	NM_001249448	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Citrus cinensis</i>			
<i>CsAGL6-like</i>	XM_006490904	MICK ^c /AGL6	NCBI
<i>CsSL1</i>	EU032531	MICK ^c /SOC1	NCBI
<i>Carica papaya</i>			
<i>CcMADS3</i>	EU659992	MICK ^c /AGL6	NCBI
<i>Medicago truncatula</i>			
<i>MtAGL6a</i>	PAC:31078699	MICK ^c /AGL6	Phytozone
<i>MtAGL6b</i>	PAC:31071096)	MICK ^c /AGL6	Phytozone
<i>Phaseolus vulgaris</i>			
<i>PvAGL6</i>	PAC:27141236	MICK ^c /AGL6	Phytozone
<i>Solanum lycopersicum</i>			
<i>SlAGL6</i>	PAC:27300134	MICK ^c /AGL6	Phytozone
<i>SITPI</i>	NM_001247146	MICK ^c /GLO	NCBI
<i>SITAP3</i>	DQ674532	MICK ^c /DEF	NCBI
<i>SITDR6</i>	NM_001324380	MICK ^c /DEF	NCBI
<i>Solanum tuberosum</i>			
<i>StAGL6</i>	PAC:24422113	MICK ^c /AGL6	Phytozone

2. Análisis estadístico de los datos de expresión génica entre variedades.

Tabla S4. Resultados ANOVA de dos vías para *FaCO*. En rojo negrita contrastes con diferencias significativas.

CHANDLER						
ANOVA (<i>FaCO</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	0,205	0,205	0,632	0,46261		
Tejido	79,270	79,270	244,444	0,00002		
Fotoperiodo * Tejido	0,392	0,392	1,208	0,32189		
Error	1,621	0,324				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		4	3,844	3,313	ns
Fotoperiodo	LD		5	3,505	3,537	ns
Tejido	Hoja		4	7,011	0,837	a
Tejido	Corona		5	0,972	0,130	b
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	2	1,042	0,074	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,925	0,152	b
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	6,646	1,231	a
PARKER						
ANOVA (<i>FaCO</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	30,738	30,738	2474,410	0,00000		
Tejido	154,651	154,651	12449,582	0,00000		
Fotoperiodo * Tejido	28,289	28,289	2277,311	0,00000		
Error	0,062	0,012				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		4	7,100	6,941	a
Fotoperiodo	LD		5	2,865	2,640	b
Tejido	Hoja		4	9,433	4,248	a
Tejido	Corona		5	0,999	0,095	b
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	2	1,090	0,033	c
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,938	0,060	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	13,110	0,225	a
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	2	5,756	0,056	b

FERN				
ANOVA (<i>FaCO</i>)	SS	MS	F	p-value
Fotoperiodo	71,552	71,552	42,711	0,00061
Tejido	1283,494	1283,494	766,143	0,00000
Fotoperiodo * Tejido	64,747	64,747	38,649	0,00080
Error	10,052	1,675		

Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		6	15,342	15,536	a
Fotoperiodo	LD		4	9,882	10,452	b
Tejido	Hoja		5	25,240	6,045	a
Tejido	Corona		5	1,076	0,201	b
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	29,502	1,377	a
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	1,182	0,177	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	18,848	2,487	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	2	0,916	0,119	c

SELVA				
ANOVA (<i>FaCO</i>)	SS	MS	F	p-value
Fotoperiodo	14,924	14,924	24,079	0,00174
Tejido	73,956	73,956	119,326	0,00001
Fotoperiodo * Tejido	10,541	10,541	17,007	0,00444
Error	4,338	0,620		

Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		6	2,471	1,893	b
Fotoperiodo	LD		5	5,562	4,053	a
Tejido	Hoja		6	6,287	2,554	a
Tejido	Corona		5	0,983	0,281	b
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	4,110	0,931	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,832	0,168	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	3	8,464	1,109	a
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	2	1,210	0,296	c

Tabla S5. Resultados ANOVA de dos vías para *FaFD2*. En rojo negrita contrastes con diferencias significativas.

CHANDLER						
ANOVA (<i>FaFD2</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	3,923	3,923	21,809	0,00068		
Tejido	1,268	0,634	3,524	0,06566		
Fotoperiodo * Tejido	1,913	0,956	5,316	0,02425		
Error	1,979	0,180				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		8	2,290	0,528	a
Fotoperiodo	LD		9	1,306	0,649	b
Tejido	Hoja		5	1,348	0,813	b
Tejido	Raíz		6	2,159	0,286	a
Tejido	Corona		6	1,731	0,955	ab
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	2,474	0,792	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,989	0,020	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	2,183	0,530	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	0,791	0,137	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	3	2,178	0,358	b
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	3	2,140	0,273	b
PARKER						
ANOVA (<i>FaFD2</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	15,929	15,929	58,850	0,00003		
Tejido	1,885	0,943	3,483	0,07580		
Fotoperiodo * Tejido	1,731	0,865	3,197	0,08932		
Error	2,436	0,271				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		8	3,627	0,587	a
Fotoperiodo	LD		7	1,506	0,722	b
Tejido	Hoja		5	2,291	1,021	b
Tejido	Raíz		5	3,177	0,954	a
Tejido	Corona		5	2,445	1,753	ab
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	3,678	0,529	a
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	2	0,595	0,572	d
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	3,228	1,071	ab
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	1,665	0,213	cd
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	3	3,843	0,344	a
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	2,178	0,272	bc

		FERN					
ANOVA (<i>FaFD2</i>)	SS	MS	F	p-value			
Fotoperiodo	7,080	7,080	46,448	0,00014			
Tejido	0,315	0,158	1,035	0,39838			
Fotoperiodo * Tejido	0,006	0,003	0,021	0,97937			
Error	1,219	0,152					
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar		
Fotoperiodo	SD		7	2,617	0,462	a	
Fotoperiodo	LD		7	1,206	0,213	b	
Tejido	Hoja		5	1,830	0,885	a	
Tejido	Raíz		4	2,081	0,938	a	
Tejido	Corona		5	1,858	0,804	a	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	2,418	0,345	a	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	2	1,019	0,027	b	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	2,731	0,545	a	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	1,230	0,259	b	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	2	2,803	0,727	a	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	1,358	0,143	b	
		SELVA					
ANOVA (<i>FaFD2</i>)	SS	MS	F	p-value			
Fotoperiodo	1,435	1,435	73,373	0,00003			
Tejido	0,595	0,297	15,209	0,00188			
Fotoperiodo * Tejido	3,016	1,508	77,131	0,00001			
Error	0,156	0,020					
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar		
Fotoperiodo	SD		7	1,76446	0,658	a	
Fotoperiodo	LD		7	1,09402	0,392	b	
Tejido	Hoja		5	1,56496	0,991	a	
Tejido	Raíz		4	1,36955	0,330	b	
Tejido	Corona		5	1,34127	0,416	b	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	1,62854	0,171	b	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	2	0,91037	0,127	c	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	2,64170	0,168	a	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	0,84714	0,137	c	
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	2	1,09111	0,104	c	
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	1,64798	0,073	b	



Tabla S6. Resultados ANOVA de dos vías para *FaSOC1*. En rojo negrita contrastes con diferencias significativas.

CHANDLER						
ANOVA (<i>FaSOC1</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	6,736	6,736	737,789	0,00000		
Tejido	5,676	2,838	310,831	0,00000		
Fotoperiodo * Tejido	4,834	2,417	264,723	0,00000		
Error	0,073	0,009				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		6	0,456	0,174	b
Fotoperiodo	LD		8	1,644	1,257	a
Tejido	Hoja		4	2,091	1,822	a
Tejido	Raíz		5	0,892	0,277	b
Tejido	Corona		5	0,614	0,344	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	2	0,250	0,012	e
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,856	0,128	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	0,513	0,035	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	2	3,668	0,072	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	2	0,605	0,116	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	3	1,082	0,101	b
PARKER						
ANOVA (<i>FaSOC1</i>)	SS	MS	F	p-value		
Fotoperiodo	10,557	10,557	2751,626	0,00000		
Tejido	4,898	2,449	638,289	0,00000		
Fotoperiodo * Tejido	4,072	2,036	530,658	0,00000		
Error	0,042	0,004				
Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		9	0,446	0,094	b
Fotoperiodo	LD		8	2,071	1,129	a
Tejido	Hoja		6	1,920	1,586	a
Tejido	Raíz		5	1,034	0,692	b
Tejido	Corona		6	0,649	0,350	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	0,335	0,063	e
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	3	0,964	0,076	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	3	0,472	0,024	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	3,368	0,058	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	3	0,530	0,022	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	1,789	0,118	b

FERN					
ANOVA (<i>FaSOC1</i>)	SS	MS	F	p-value	
Fotoperiodo	14,701	14,701	192,220	0,00000	
Tejido	24,035	12,018	157,139	0,00000	
Fotoperiodo * Tejido	12,493	6,247	81,677	0,00000	
Error	0,612	0,076			

Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		8	0,861	0,476	b
Fotoperiodo	LD		6	3,012	2,598	a
Tejido	Hoja		4	3,884	2,852	a
Tejido	Raíz		5	1,227	0,364	b
Tejido	Corona		5	0,658	0,426	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	0,353	0,025	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	2	1,116	0,163	bc
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	2	1,439	0,109	bc
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	2	6,329	0,696	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	3	0,984	0,202	c
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	1,592	0,070	ab

SELVA					
ANOVA (<i>FaSOC1</i>)	SS	MS	F	p-value	
Fotoperiodo	12,213	12,213	330,064	0,00000	
Tejido	7,690	3,845	103,917	0,00000	
Fotoperiodo * Tejido	5,950	2,975	80,406	0,00000	
Error	0,370	0,037			

Post-Hoc LSD	Factor	Factor	n	Media	Desviación estándar	
Fotoperiodo	SD		9	0,47380	0,170	b
Fotoperiodo	LD		7	2,50708	1,461	a
Tejido	Hoja		6	2,29730	1,915	a
Tejido	Raíz		5	1,00553	0,594	b
Tejido	Corona		5	0,60046	0,446	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Corona	3	0,27783	0,019	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Corona	2	1,08439	0,119	c
Fotoperiodo * Tejido	SD	Hoja	3	0,56416	0,083	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Hoja	3	4,03044	0,383	a
Fotoperiodo * Tejido	SD	Raíz	3	0,57939	0,149	d
Fotoperiodo * Tejido	LD	Raíz	2	1,64475	0,052	b

3. Mediciones del estolonado y conformación de los grupos usados para los distintos experimentos.

Tabla S7. Mediadas del estolonado en la población segregante. Entre paréntesis número de estolones producidos. * La medición en la campaña 2013 finalizó antes, por el muestreo para RNA-seq. Al final de la tabla se explica el código de colores. † Planta muerta.

Planta	2008	2009	2010	2012	2013*	Planta	2008	2009	2010	2012	2013*
1	SI	NO	SI	NO	NO	2	SI	SI	SI	SI (6)	SI (2)
3	SI	SI	SI	SI (44)	SI (11)	4	SI	NO	NO	NO	NO
5	NO	NO	NO	NO	NO	6	SI	SI	SI	SI (11)	SI (6)
7	SI	SI	SI	SI (1)	NO	8	SI	SI	SI	SI (21)	SI (21)
9	SI	SI	SI	SI (14)	SI (6)	10	SI	SI	NO	NO	NO
11	NO	SI	NO	SI (1)	NO	12	SI	SI	NO	SI (1)	SI (3)
13	NO	SI	NO	SI (1)	NO	14	NO	NO	SI	NO	NO
15	NO	SI	SI	NO	NO	16	SI	SI	SI	SI (4)	NO
17	SI	SI	†	†	†	18	SI	NO	SI	SI (2)	NO
19	SI	NO	†	†	†	20	SI	SI	SI	SI (72)	SI (16)
21	SI	SI	SI	SI (15)	SI (3)	22	SI	SI	SI	NO	NO
23	SI	SI	SI	SI (19)	NO	24	SI	NO	NO	NO	NO
25	SI	SI	SI	SI (15)	SI (4)	26	SI	SI	SI	SI (3)	SI (1)
27	SI	SI	SI	SI (6)	SI (2)	28	SI	SI	SI	SI (10)	SI (3)
29	SI	SI	SI	SI (23)	SI (9)	30	SI	SI	SI	SI (22)	SI (30)
31	†	†	†	†	†	32	SI	SI	SI	SI (1)	SI (2)
33	SI	NO	NO	NO	SI (5)	34	SI	NO	NO	SI (2)	NO
35	NO	SI	SI	SI (12)	SI (5)	36	NO	SI	SI	SI (2)	NO
37	SI	SI	SI	SI (1)	SI (3)	38	SI	SI	NO	SI (1)	NO
39	NO	SI	SI	SI (13)	SI (2)	40	SI	SI	SI	SI (12)	SI (3)
41	SI	NO	SI	SI (17)	SI (2)	42	SI	SI	SI	SI (1)	NO
43	SI	NO	SI	NO	SI (4)	44	NO	NO	NO	NO	NO
45	SI	SI	SI	NO	SI (7)	46	SI	SI	SI	SI (2)	SI (5)
47	SI	NO	SI	SI (18)	SI (7)	48	NO	NO	†	†	†
49	SI	NO	†	†	†	50	SI	SI	SI	SI (17)	SI (8)
51	NO	SI	NO	NO	SI (13)	52	SI	NO	†	†	†

Planta	2008	2009	2010	2012	2013*	Planta	2008	2009	2010	2012	2013*
53	SI	SI	SI	SI (15)	SI (7)	54	SI	SI	SI	SI (3)	SI (6)
55	NO	NO	SI	NO	NO	56	SI	SI	SI	SI (34)	SI (22)
57	SI	SI	SI	NO	SI (4)	58	SI	SI	SI	NO	NO
59	SI	SI	NO	SI (2)	SI (6)	60	NO	NO	NO	NO	NO
61	NO	NO	NO	NO	NO	62	NO	SI	NO	NO	SI (1)
63	NO	NO	NO	NO	SI (1)	64	SI	NO	†	†	†
65	†	†	†	†	†	66	SI	SI	SI	SI (3)	SI (9)
67	SI	SI	SI	NO	SI (2)	68	SI	SI	SI	SI (6)	SI (14)
69	NO	SI	SI	SI (4)	SI (4)	70	SI	SI	NO	NO	SI (9)
71	SI	SI	SI	SI (4)	SI (1)	72	SI	SI	SI	SI (2)	SI (2)
73	NO	NO	NO	NO	NO	74	NO	NO	†	†	†
75	SI	SI	SI	SI (7)	SI (12)	76	SI	SI	SI	SI (4)	†
77	SI	SI	SI	SI (23)	SI (8)	78	SI	NO	SI	SI (25)	SI (9)
79	SI	SI	SI	SI (11)	SI (15)	80	SI	SI	SI	SI (26)	SI (28)
81	NO	NO	NO	SI (1)	SI (13)	82	SI	SI	SI	SI (48)	SI (26)
83	NO	NO	NO	NO	NO	84	SI	SI	SI	SI (20)	SI (12)
85	SI	SI	SI	SI (1)	SI (12)	86	SI	NO	SI	SI (1)	SI (2)
87	SI	SI	SI	NO	SI (1)	88	SI	SI	SI	SI (2)	SI (14)
89	SI	SI	NO	NO	SI (15)	90	SI	SI	SI	SI (8)	SI (12)
91	NO	SI	NO	SI (3)	SI (4)	92	SI	SI	SI	SI (13)	SI (14)
93	SI	NO	NO	NO	SI (3)	94	NO	NO	NO	NO	SI (1)
95	SI	SI	SI	SI (5)	SI (1)	96	NO	NO	NO	NO	SI (2)
97	SI	SI	SI	NO	NO	98	SI	NO	SI	NO	SI (15)
99	SI	NO	NO	NO	NO	100	SI	SI	SI	SI (4)	SI (6)
101	NO	SI	SI	†	†	102	SI	SI	SI	SI (19)	SI (6)
103	NO	SI	SI	SI (10)	NO	104	†	†	†	†	†
105	NO	SI	SI	SI (2)	SI (4)	106	SI	SI	SI	SI (37)	SI (19)
107	SI	SI	SI	SI (2)	SI (9)	108	SI	SI	SI	SI (6)	SI (13)
109	SI	SI	SI	SI (33)	SI (9)	110	SI	SI	SI	SI (16)	SI (9)
111	NO	NO	NO	NO	SI (2)	112	NO	SI	SI	SI (4)	NO
113	NO	SI	SI	SI (2)	SI (11)	114	NO	SI	SI	SI (2)	SI (4)
115	SI	NO	SI	SI (9)	SI (6)	116	NO	NO	NO	SI (1)	SI (2)
117	SI	SI	SI	NO	SI (5)	118	SI	NO	SI	SI (1)	NO
119	SI	SI	SI	†	†	120	SI	SI	NO	SI (13)	SI (1)

Planta	2008	2009	2010	2012	2013*	Planta	2008	2009	2010	2012	2013*
121	NO	NO	NO	NO	NO	122	NO	NO	NO	SI (7)	SI (3)
123	SI	SI	SI	†	†	124	SI	SI	SI	SI (8)	SI (17)
125	NO	NO	NO	SI (7)	SI (7)	126	SI	SI	SI	†	†
127	SI	NO	SI	SI (1)	SI (1)	128	SI	SI	SI	SI (34)	SI (10)
129	SI	SI	SI	SI (54)	SI (9)	130	SI	SI	SI	SI (2)	SI (12)
131	SI	SI	SI	SI (2)	SI (12)	132	SI	SI	NO	SI (7)	SI (8)
133	NO	SI	SI	SI (2)	†	134	SI	SI	SI	SI (24)	SI (7)
135	SI	NO	SI	SI (14)	SI (8)	136	SI	SI	SI	SI (25)	SI (1)
137	SI	SI	SI	SI (10)	SI (6)	138	SI	SI	SI	SI (7)	SI (3)
139	NO	SI	NO	SI (3)	SI (4)	140	SI	SI	SI	†	†
141	SI	SI	SI	SI (27)	SI (24)	142	SI	SI	SI	SI (16)	SI (32)
143	SI	SI	SI	SI (20)	SI (9)	144	NO	NO	NO	NO	SI (1)
	Plantas integrantes del grupo R1. Usado para identificación de AFLPs (Resultados previos; datos de 2008/2009)										
	Plantas integrantes del grupo R2. Usado para identificación de AFLPs (Resultados previos; datos de 2008/2009)										
	Plantas integrantes del grupo N1. Usado para identificación de AFLPs (Resultados previos; datos de 2008/2009)										
	Plantas integrantes del grupo N2. Usado para identificación de AFLPs (Resultados previos; datos de 2008/2009)										
	Plantas integrantes del grupo RR ²⁰¹² . Usado para análisis de Microsatélites y DArTs. (Datos de 2012)										
	Plantas integrantes del grupo NR ²⁰¹² . Usado para análisis de Microsatélites y DArTs. (Datos de 2012)										
	Plantas integrantes del grupo RR ²⁰¹³ . Usado para secuenciación masiva mediante RNAseq. (Datos de 2013)										
	Plantas integrantes del grupo NR ²⁰¹³ . Usado para secuenciación masiva mediante RNAseq. (Datos de 2013)										

4. Listado cebadores usados en el mapeo del *locus R*.

Tabla S8. Listado de cebadores usados en el mapeo por microsatélites. Tm es la temperatura de anillamiento de la pareja de cebadores.

Nombre	Motivo	Tamaño	Tm	Cebador F	Cebador R
ChFaM001	(AG)20	240	58	GGAGATTATGCACAAAATATAGAGAA	CCAGAACTCCATCAGCCTCT
ChFaM002	(TC)11	173	59	CGCAAACCCCTAATCTCCT	ATTCGGGAATGTGAAAAACG
ChFaM004	(GA)8	173	58	GCTTCAAATACTCCCCAGCA	TCCTTTCTTCATCCCCTCCT
ChFaM005	(TC)19	158	59	ATCGCGTTCATTCTTTTGA	GACCCATATAGTCTCCAATAAAAGC
ChFaM007	(TC)13	156	60	AATATATTACTCATCCAATCTGTCCA	AGATGGAGGGCTTGAAGTT
ChFaM011	(TC)15	131	61	TCCTCTCCTCTTTCCCTCA	CGAGATCTCCCGAGACTGAG
ChFaM014	(AG)11...(AG)7	165	59	GGGAGGTTCTGCTTTTAGGG	GGTCACCTGCCTGTTGATCT
ChFaM017	(CT)8...(TCG)5	128	58	CTCACTCTCTGCGAACTTGC	TCCTCCCTTAGCCATCAGA
ChFaM018	(TC)8...(TC)3...(TC)5	217	62	AGCCGCATCCCTCTTTTCTA	CTAGGGATTGAGGACCGACA
ChFaM021	(AT)13	229	59	CACCTGTTGCAGTTGTGTGA	GAATGAAAATACTTGTTTTGAGATCG
ChFaM022	(AG)24	212	61	GGGCCACTCCTACTTCTTCA	TTGGCCTTGAGAGCTTCGAT
ChFaM023	(AG)14	152	62	AGGAGAAGACCGGCTGTGTA	TGCCTATAGCTGTGGCTGTG
ChFaM026	(AAG)14	113	58	TCGTCTCTCGTTTCTAAAAGC	CGGGCTGATCAAAATCTTTC
ChFvM028	(CTT)6	175	58	AATGGCATCAACTTCTGCAC	CAGCCTGCTGCTGTAGTTCT
ChFaM029	(TG)8...(TTTG)5	166	62	ACTTCATCGCCAGAATGGTC	GCCATTCAATACACAATCCAA
ChFaM030	(TCTCT)5	176	58	CCATGAAGCAGTGAAGTCCA	AGAAAATCCCGAGAGCCTTT
ChFaM032	(TTC)9	210	59	GGTCCCTGCTTCTTCTTCTT	TTCAGCCCCATTTTCCAGTA
ChFaM036	(ATG)9	209	57	GCAGCCTCAAGAAGTGAAGG	CCATCTTGATATCACAGGCATAA
ChFaM037	(AAG)6	196	62	ACGACGATCACCACAAGGAC	AAGCTCCGTCGTTTCTCTT
ChFvM049	(AAG)7	159	58	ATGGTTGGTGATCAATGGTG	TTCATATGCAATTTGATGGAAC
ChFvM050	(TC)22	156	57	CCCTTCCCTTTCCTTTCCTT	TAATGGGGTGGTGGAGTTCA
ChFaM056	(GCA)6	208	58	AAAACGTCGTCGTTTCCAGGAT	CGTACTGCTGTTGCTGCTGT
ChFaM060	(CCG)6	201	58	TGAGCTACCACCAAGAACCC	AATACCTTGGTACCCCTCG
ChFaM061	(CTT)6	203	58	GTGCTCAAGAAACCTTTTCG	GCGCTAGCAACAGTAAGGTG
ChFaM062	(TGA)5...(TTG)6	167	58	GGTTTCGCTTGGAGGATATG	CACCAAATCTCTGATCACA AAAA
ChFaM064	(CGA)6	177	58	CACCAACTTCGACAACCTCA	GACTCTTCTTTGGCGAGCTG

Nombre	Motivo	Tamaño	Tm	Cebador F	Cebador R
ChFaM065	(GTG)6	162	58	GACCGGGAGAGATAACAGCA	ATAGAAGCCAATGCGTGATG
ChFaM066	(CTT)5...(GT)8	232	58	ATTTTGGCCACGAAGAATTG	CGATGTCAGGAACGAACTGA
ChFaM067	(AAC)5	171	58	AGAACCAGCAAGAGCAGCAC	CAGCTCTGTGTATGCCTGGA
ChFaM068	(GAA)5	155	58	CATCTCCAGTTCCTTGGCTC	ACGACCATTCTCTTCTCA
ChFaM073	(CAC)5	149	58	CCACCGAAGAACCAAAAGAA	AACTGGTGCAACTGGAGCTT
ChFaM077	(ATG)5	225	57	GAAAGGGCTGGACATGGATA	ATGTTGTTATTTGGCCTGCT
ChFaM078	(CCT)5	250	60	CAGCCTCATTGCAATCTGA	CTTACCGTTTTCGATGTGGT
ChFaM079	(ACT)5	192	60	TCGAGTTCTACGTTGCTGA	CCGTGCAATCAAATCACACT
ChFaM080	(GAC)5	219	60	TTCGGTGCCGGTAAAGATAC	AAGTCCACCACCATGCAAT
ChFaM083	(ACT)5	191	57	TTTTCTGGCTTTTGGATTGG	GCACTTTTTCATCACAGGCA
ChFvM084	(TTGA)5(GA)6	151	61	CCAAACAGTCTCACGGTTC	GTAGCACCAGCAACATGACG
ChFaM085	(GGT)5	164	61	AGATGGGTCATTTTCTGACGA	GTAGTGCATGTCCGCCACTT
ChFaM086	(GGT)5	208	61	TTTGGAGCTCAATCCCATCTG	ATTTGGCCAGCCTCCGTCT
ChFvM087	(GAA)9	224	60	GAAAGGGGAAGCCTTTTCAT	TGGGACGAAAGTTCCCAATA
ChFaM095	(AG)7	164	58	GCCAGAAGCAAAAACCAGAA	GGGAAGTTGAAATTGTCGGA
ChFaM097	(TC)7	236	58	GCCAAAGGTTGGTCTTTGA	GCCATTTTGAAGAGGTGAA
ChFaM098	(TC)7	214	58	GTGAGAGTCAGCCCACCCTA	GCGACGAGGATGAAGAAGAG
ChFaM100	(CT)8...(CT)7	121	60	TTGGAACCCAGAAAATCGAA	CAGCGGAGAGAGAAAACAAGG
ChFaM101	(AG)7	157	58	GGAGTAAGCTGATCACTCTGT	ACTCCGAGGCTGTAATCCCT
ChFaM103	(CT)7	160	58	CATCTCTTCTCTTTCCGATCT	GAGCACAATGCGGTTGTAGA
ChFaM105	(CT)7	198	57	CCTCCAAACACAATCCACCA	TCTGAGGTTTATGCGGGACT
ChFaM106	(AG)7	139	59	ACCAACCGAGGCGAGAGAG	CGTCATCTGCACCTGCTTC
ChFaM107	(AT)7	196	58	TGCCAAACAAACAAATGTTGA	CATATCGATGTCCTTCATAGGG
ChFaM108	(GA)6	171	60	CATGGAAAGAGAGCGAAAGC	CGAGGAATGAGGGAGGAATC
ChFaM111	(TC)8...(TC)6	188	61	GCCCAACCGAGTCTCTCTCT	CGGGCTTCAATTTGCTCAAT
ChFaM117	(AAC)5	156	58	CCAAGGCGATTCTATCTTGC	GAGGAGTCTGGTGTCTGAAGC
ChFaM120	(TTC)5	162	59	GGTTTCATCAGAGGGCGTCTT	TAAAGCTCCCAGCAGGCATT
ChFvM125	(AG)9	167	60	GCGACTGCCATCGTAACCTA	TCTCCAATGTTTTCGCCAAG
ChFaM126	(AGG)6	191	61	GTTAGGGAGTCCGGGAATGA	TTCCAATCCCATCTGACGAC

Nombre	Motivo	Tamaño	Tm	Cebador F	Cebador R
ChFaM129	(TC)6	190	60	AGATCAACATCGCCTCCAAC	TGCTCGTTGTCCATAACCTG
ChFaM130	(CCT)6	202	61	GCCAGTCACAAGAAGCCAAA	TGCTCTGAAACCCCTTTATCTG
ChFaM141	(GA)7	142	57	AAAAGAAGGGAAAAGAAATTGG	ACTCAAGCTCGCAAAGAAGC
ChFaM142	(TTC)5	188	59	TGCTCAGCTGCTTCTTGCTC	CAGCCATTGGTGACATGCTT
ChFaM145	(CAC)6	128	58	CCACCGAAGAACCAAAAAGAA	AACTGGTGCAACTGGAGCTT
ChFaM146	(GGA)5	124	58	ACGAGGGAAGAATGGAGCAC	AGATGGTCTGACTGGATGG
ChFaM148	(AT)7	158	58	CCCTCCATCAAAGCCAGTT	CATTAGACCCCGACTTGCA
ChFaM151	(CT)7	211	60	ACCACCACCGTTTTCTCCTC	ACCACCGACTCGTCCTTCTT
ARSFL_31	(AG)10	219	59	CGACCCAGCGACTACATTG	ACTTTAACCGCCACCAACTG
FAC-006a	(GT)5...(TC)3...(TC)7	213	60	ACTGGTGGAGGAGAGGACTGTA	TGTGGAGCAGAGAGAATTGAAG
ChFaM159	(CT)13	136	63	TCTCTCATCGCCCCAGAG	ACCCATCCACAGGGTTCTTG
ChFaM160	(ATG)7	190	62	CCACTCCCCAAAAGAGCACA	CTGCCTCCACAATCCTCACC
ChFaM161	(TTC)7	206	61	CGAGGCCTTGTCTTCTTTGT	GCGGAGGTAGCTGTTGTAGC
ChFaM163	(AT)9	117	59	GAATTCGGCACGAGGTATTG	CAATTCCGAAGGCACAACCTT
ChFaM164	(CT)8	151	63	CACTCAGCCAGATCCAGAGC	GCGCCAAGGATGGTCTTAAT
EMFn160	(CT)24	219	57	GCATCCTTGGGAAATTAATGC	TTGGGAAGGATCATAAAAACC
UFFa02H04	(TCG)6	202	61	ATCAGTCATCCTGCTAGGCACT	TACTCTGGAACACGCAAGAGAA
ChFaM170	(GTGA)4	168	57	CGGGAGAAAATGAAAAAGGA	TACTTGGTTCGGCAACACT
ChFaM171	(TA)11	184	59	TGCGAGATTGCTGAATGAAA	TCTCCTCAATGCCCTTGAAC
EMFvi136	(TC)11	164	61	GAGCCTGCTACGCTTTTCTATG	CCTCTGATTCGATGATTTGCT
UDF-002	(AC)13	129	57	TATGGCCAGGATTGTTTGCT	TAGGAGGAGGCGTTGAAATG
UFFxa01E03	(CAC)10	162	63	CAAACCTCCCAACCCCATCTT	AGCAACGAGTCGAGAGCAAG
ChFaM177	(AAG)5	143	63	CCTGCAGAGTGCAAGAGAGA	CACTCACAAGGCATGAGAGCTA
FAC_003a	(GAA)5...(TA)7	166	59	AAGCTAATTCTCAGGCCACAAG	TTCATTGCCAGTTTGAATTACG
ChFvM182	(CAA)6...(ACA)5	210	63	GGAACCAAACGAACCCAAC	GCGGAGGAGTGAGTGAAGAC
ChFvM184	(GAT)12...(TGA)6	244	61	GCACTTTGGGGTTTTGGGTA	TTGCAAGAACCCCTTCCTA
BFACT002	(GA)24	213	57	ACTAGGAAGATGCGGTGTGG	GCAGGGCTTCAGAGAAATCA
BFACT036	(GA)4...(GA)18	148	61	TGCAAGCTGACAAACAGAAAA	TCGGATCGATGTTACTTTCAGA
BFACT037	(CT)9	197	61	CGTCCACGATCACATACACAC	GAAAGGGAGTTGAGCGAAAA
UFFa03B05	(AGC)6...(CAG)5	109	58	GCAGACTCCAAGCAACAACA	TGTCATCTACGGCCAAAACA

Nombre	Motivo	Tamaño	Tm	Cebador F	Cebador R
ChFvM191	(CAA)7(CAG)15	231	61	CCAGCAGAATCCTCAAATGC	GTGCCAACAAAGCCCATTG
ChFaM194	(CT)15	193	61	CCCTTCCTTGCCAGTCATT	CCCATCCCACAGTTGTTCTC
ChFaM195	(GA)8	210	58	CAAGCTGAAGAAGGGTTGTG	GCATTGGTTCTCTTTTCAGGA
ChFaM196	(CTT)14	156	60	CCTCTCACCTCTTTCTCTCTAAAA	AGCGCATGAGTCTGCTGTTA
UDF-004	(GT)11	133	56	GCTTGCATTTCAATAGCTGGA	TTTACTGATGCAGGAGTAGAATGA
UDF-005	(GT)15	220	61	CACTTAAGGAGCTTTTGAACATTG	GCAGGTGATGAATACCAGAATG
EMFv023	(GA)16...(GA)10	204	63	AATTACCGAGCCTCCACACTA	CAGCGCTAAAGCGGTTGC
ChFvM201	(TC)10	161	61	TGATTCAACTCCAGCGAAGC	ATCAGCAGGCGAATCCTTCT
ChFvM202	(GA)21	185	62	CAAAGGGCTCCAGCTATCTC	AGGATCGTCAGCTAAGAAGCA
ChFaM203	(GA)17	150-210	58	CGAGGGTACGGCTACTAAA	TGAGTATGACCAATCCGAAAGA
UFFa15H09	(CAGAG)6	210-280	63	TTAGTAGTAGACCTGCCACAAGG	CGGCTTATCTGTAGAGCTTCAA
ChFvM205	(ATT)14	152	61	GCGAAACCCTATGGATTGTT	ACAACCACCAAATCCCATT
ChFaM209	(CTCTT)4	144	60	CCCCAAAACCCTCTATTCT	ATCATTCCCAAGCCACTGTC
ChFvM210	(TC)23	220	59	TCCCCACATTTTCTTGT	GTGGTGTGGTGAGTGGAGA
ChFvM212	(TCT)7	115	60	CAAATCTTCAACGGTCTCTCC	ACGGAGGAGGAGGAAGTCAT
ChFvM213	(GA)9	215	60	AACCCTAGGAGGCTGAAACC	ATACCCCGGGTGGTACTTGT
EMFn049	(AG)30	235	TD*	GCTAGCGTTCAAATTAAGACCA	GGTATCGGATTGAGGAAATCAA
UFFxa16H07	(CT)11	248	TD*	CTCTACCACCATTCAAACCTC	CACTGGAGACATCTAGCTCAAAC
EMFv029	(TG)12	186	58	TACTATTGAAGAACTCCTACTGA	TCTTTGATCTGCTCCACCTT
BFACT-045	(GA)9	166	57	GAGGCAGAAGTGTTCGTG	ATGTAGGCACCCCCTCAA
ARSFL-007	(CT)14(GA)13	256	56	GCGCGCATAAGGCAACAAAG	GCGAATGGCAATGACATCTTCTCT
CFVCT017	(CT)21	128	59	GCATCTCAAAGCTCTCACG	GCCTAAACCAAACCCAAAATC
BFACT-029	(CT)4...(CT)10	242	57	AGGGTGGGTTGTGTAAATCCT	TGAAATGCCAGAGAGACAACCTT
ChFvM230	(CAA)6	199	59	GGGCAGATCGGTCAGATAGT	CCATGTCCAAGATGGAGTCA
ChFvM231	(AG)11	152	59	CGCCATTTGATATCCCACTC	GGCCCAATATCAGCAATTA
ChFvM232	(CT)22	197	59	GCTTCTGGGACAGCAACAC	TGAACCCTGCATTTCTCTG
ChFvM234	(AG)6	171	59	GCCATTGCATTTCTCACTT	CATGAGCTTCTCGCAGAGGT
ChFvM235	(AG)20	177	59	GGTGTGGTGGGGTTATTTG	ACCACTGTCTGGTGACATT
BFACT-010	(AG)15	151	57	TGTCATTTCTCCAGTCTTATTCC	CAGCAACATCCATGGCTACC

Nombre	Motivo	Tamaño	Tm	Cebador F	Cebador R
BFACT-041	(AG)7	181	57	TAGGTGTGGAGAAGCCCAAC	GCCCAGGTAAGGAGAGGAGA
BFACT-047	(AG)16	163	57	ATCGTACCTATGCATCATCTGC	AGGCAGGACCATCAACTAAGAG
EMFv013	(CGG)4	203	62	CGGTGCGGCGGTGCAACTC	GGTTTGATGGCCCTTTGCTGGATG
ARSFL-092	(CT)8(GA)13	179	59	TCCGGTGACGAATCTAAAGG	GAAGAACAAGCACCACCACA
ChFvM244	(CT)15	223	61	TCCTCTGCCTACTTCCCCTA	CCTCTGTGCTTGAGTGAGCA
ChFvM245	(CT)12...(CCT)5	198	57	TCAACCACACCGCTACTCCT	CTTGCTGAGCTCGTCCTTGT
ChFvM246	(GAA)9	233	62	AGTGAGGTGAAAGGGGAAGC	CTGGGACGAAAGTTCCCAAT
ChFaM247	(CT)12(CA)12	222	62	GATGGCCAGTGGTACGATGT	TGCTCACTGTGGTTCTGTGC
EMFn182	(GT)8	179	TD*	GCAACAAAGGAGGTTAGAGTCG	TGGTGAGTGCTCATTGTTCC
EMFv143	(TC)16	188	TD*	ACAATTGGAGCGACACCTTC	CCGCGGTTTGATGAGTAAAA
ARSFL-010	(GA)20	252	TD*	GCGTCAGCCGTAGTGATGTAGCAG	GCGCCAGCCCCTCAAATATC
ARSFL-017	(CT)10	218	TD*	GCGCATCACAATCGCCATAGAAAC	GCGAACACGCCTTCAACAACCAC
EMFvi166	(AG)11	270	TD*	ACCGACAGCTGAGTTAGAGGAG	AGTCATAGGACCCCACTTCAAA
EMFn010	(TC)22	191	TD*	GATTAATGCCAGTGATGGAAT	CACTGTGGAAGTATGTGTTGGG
EMFn228	(CT)9	254	TD*	TTGCTGAGGATTTGAAAATGG	TGAAGTTTACTGGCGTTTGC
EMFn117	(CT)15	175	TD*	ATCGGATCAACAAGCAAAGC	ATGGATGAGGGGAGAAGAGG
ARSFL-022	(GA)11	158	TD*	GCGAACCCCATTAACAGCTTCA	GCGATCAAATTCCCCTCTAACAAT
EMFn153	(CT)13	246	TD*	CTCGAGCTCCCTTTCTATCG	TGGCCAAATGTTCTCACTAGC
BFACT-018	(GA)9	218	TD*	AGGATCGGAGAACAGCAGAG	CTCCCTCCTCTCCAAGTGTG
EMFv021	(AG)7	196	TD*	TCATTTTTCAGGGCCACGGGTAGA	GTGGTGGTTGAGGCAGTGGAGGAT
ChFaM262	(AGAA)4	171	62	ACTCGGTGAGGAAAGACGAA	AGAGAAGACCGCTGAGGATG
UDF-034	(AC)11	136	TD*	TGAATCCCTTTCCACATGCT	GTTTGTGTGCTGGGTTCTCTC
EMFv020	(GTC)8...(GTC)3	158	64	CAGGCGCCAACGGCGTGCTCTTGT	CAGCGCCGCGCTCATCCCTAGG
BFACT-003	(TC)20	205	57	GGCTTTCCGTTTGAGTAGGG	ATATCGGTTGGGGAGGGC
BFACT-005	(TC)15	153	57	TGGGTCTCTCACACAAAGTCC	CTGAAATTGAAGCGAGGAGC
BFFv11-05-02 FGVI	(GA)10	216	TD*	ATCTTCCCATGACTTGATCAGC	CCAAGTGTGAGATTCTTTGTCC

5. Factores de transcripción presentes en la experiencia de RNA-seq.

Tabla S9. Tabla de factores de transcripción presentes en la experiencia de RNA-seq con tasas de cambio mayor de 2. En verde sobre-expresados en el grupo de plantas estolonantes (RR²⁰¹³), en rojo inhibidos en RR²⁰¹³. Ordenados de mayor a menor según su tasa de cambio.

	Familia TF	Gen Fv	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold change	p-value
1	ERF	gene27604	Ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	136,58	7,42	129,16	18,41	0,000006
2	GeBP	gene16486	DNA-binding storekeeper transcriptional regulator	1,76	0,16	1,60	11,02	0,000029
3	ERF	gene21091	Ethylene-responsive transcription factor ERF110	184,75	22,04	162,71	8,38	0,000005
4	bHLH	gene17430	Transcription factor bhlh62-like	26,51	5,19	21,31	5,10	0,000096
5	bHLH	gene32346	Transcription factor bhlh120-like	4,75	1,23	3,53	3,87	0,000088
6	MYB	gene12738	Transcription factor tt2-like	6,52	1,71	4,81	3,81	0,000101
7	ERF	gene09137	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-1-like	6,42	1,77	4,66	3,64	0,000216
8	ERF	gene08873	Ethylene-responsive transcription factor ERF039-like	2,05	0,64	1,41	3,20	0,000098
9	MYB	gene25685	Myb-like transcription factor 1	24,60	7,69	16,91	3,20	0,000218
10	C2H2	gene15032	Zinc finger	17,17	5,90	11,27	2,91	0,000101
11	HD-ZIP	gene05590	Homeobox-leucine zipper protein hat22-like	69,41	24,05	45,36	2,89	0,000029
12	ERF	gene21165	Ethylene-response transcription factor 2-like	165,04	58,57	106,48	2,82	0,000309
13	G2-like	gene31899	DNA binding	65,27	23,72	41,55	2,75	0,000056
14	TCP	gene32370	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	270,96	102,25	168,72	2,65	0,000025
15	G2-like	gene13545	Myb family transcription factor apl-like	10,71	4,23	6,47	2,53	0,000248
16	bZIP	gene14942	Basic leucine-zipper 44	76,27	30,41	45,86	2,51	0,000042
17	ERF	gene23873	Ethylene-response transcription factor RAP2-10	15,18	6,06	9,13	2,51	0,000784
18	Trihelix	gene30156	Trihelix transcription factor gt-2-like	12,84	5,15	7,69	2,49	0,000072
19	LBD	gene05722	Lob domain-containing protein 38-like	126,63	55,81	70,82	2,27	0,000447
20	bHLH	gene01894	DNA binding	347,12	162,53	184,58	2,14	0,000670
21	ERF	gene11882	Ethylene-response transcription factor TINY	120,81	56,97	63,84	2,12	0,000037
22	LBD	gene25294	Lob domain-containing protein 1-like	8,21	3,88	4,34	2,12	0,000712
23	LBD	gene23226	Lob domain-containing protein 1-like	1,91	0,93	0,98	2,05	0,000570
24	RAV	gene03871	Ap2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1-like	371,33	184,51	186,82	2,01	0,000224
25	MYB_related	gene09510	Transcription factor myb1r1-like	26,81	13,34	13,47	2,01	0,000462
26	G2-like	gene19641	DNA binding	3,15	1,57	1,58	2,00	0,000400
27	SBP	gene22660	Squamosa promoter-binding-like protein 9-like	4,66	9,52	-4,86	-2,04	0,000166
28	C3H	gene20982	Zinc finger ccch domain-containing protein 29-like	507,63	1037,40	-529,76	-2,04	0,000600
29	bZIP	gene30252	bzip transcription factor bzip39	19,63	40,48	-20,85	-2,06	0,000021

	Familia TF	Gen Fv	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold change	p-value
30	NAC	gene34006	NAC domain containing protein 50	1,39	2,87	-1,48	-2,07	0,000031
31	GRAS	gene30172	gras family transcription factor	9,74	20,19	-10,46	-2,07	0,000080
32	TCP	gene30370	Transcription factor tcp2-like	23,56	49,18	-25,62	-2,09	0,000307
33	SBP	gene00196	Squamosa promoter-binding protein 1-like	4,09	8,59	-4,50	-2,10	0,000042
34	HB-other	gene05500	Homeodomain-like transcriptional regulator	0,90	1,91	-1,01	-2,11	0,000073
35	WRKY	gene13547	Probable WRKY transcription factor 70-like	6,55	13,89	-7,34	-2,12	0,000572
36	bZIP	gene08757	Transcription factor bzip	0,90	1,92	-1,02	-2,14	0,000304
37	WRKY	gene12308	WRKY transcription factor 11	91,40	196,53	-105,12	-2,15	0,000014
38	HD-ZIP	gene25942	homeobox-leucine zipper protein hat5-like isoform 1	41,68	89,72	-48,05	-2,15	0,000724
39	bHLH	gene10501	Transcription factor myc2-like	428,44	924,78	-496,34	-2,16	0,000227
40	AP2	gene28574	Ethylene-responsive transcription factor 109-like	40,15	87,00	-46,84	-2,17	0,000180
41	WRKY	gene32076	Probable WRKY transcription factor 53-like	357,18	775,87	-418,69	-2,17	0,000896
42	bHLH	gene08411	Transcription factor pif1-like	0,53	1,16	-0,63	-2,17	0,000460
43	SBP	gene06295	Squamosa promoter-binding-like protein 13a-like	7,44	16,24	-8,79	-2,18	0,000798
44	C2H2	gene00903	Indeterminate -domain isoform 2	10,05	22,17	-12,12	-2,21	0,000900
45	bHLH	gene25273	Transcription factor bhlh63-like	7,41	16,35	-8,94	-2,21	0,000110
46	C2H2	gene20264	Zinc finger protein nutcracker-like	4,12	9,15	-5,03	-2,22	0,000293
47	MYB_related	gene18104	Transcription factor asg4-like	1,74	4,02	-2,28	-2,31	0,000795
48	Trihelix	gene20074	Hydroxyproline-rich glyco protein	13,18	30,50	-17,33	-2,32	0,000164
49	TCP	gene27171	Transcription factor tcp4-like	8,90	20,63	-11,72	-2,32	0,000754
50	MYB	gene00185	R2R3-myb transcription factor	133,52	312,56	-179,04	-2,34	0,000188
51	bZIP	gene29159	bzip transcription factor 60-like	106,35	249,29	-142,94	-2,34	0,000098
52	NAC	gene18590	NAC domain-containing protein 74-like	2,23	5,28	-3,05	-2,37	0,000007
53	NAC	gene17203	NAC transcription partial	30,75	73,56	-42,81	-2,39	0,000066
54	HSF	gene23802	Heat stress transcription factor a-4a-like	9,45	22,93	-13,49	-2,43	0,000005
55	NAC	gene34004	NAC domain-containing protein 69-like	1,86	4,58	-2,72	-2,46	0,000319
56	ERF	gene10845	Ethylene-responsive transcription factor 5	26,14	65,03	-38,89	-2,49	0,000157
57	FAR1	gene19368	FAR1-related sequence 5	2,89	7,20	-4,31	-2,49	0,000901
58	WRKY	gene13803	Probable WRKY transcription factor 33-like	162,00	408,90	-246,90	-2,52	0,000216
59	WRKY	gene13546	Probable WRKY transcription factor 70-like	1,86	4,93	-3,07	-2,65	0,000293
60	WRKY	gene18438	Probable WRKY transcription factor 49-like	1,91	5,28	-3,37	-2,77	0,000285
61	TALE	gene20865	BEL1-like homeodomain protein 9-like	0,81	2,29	-1,48	-2,81	0,000279
62	WRKY	gene21365	Probable WRKY transcription factor 70-like	36,53	121,31	-84,78	-3,32	0,000435
63	WRKY	gene22024	Probable WRKY transcription factor 51-like	3,10	10,45	-7,35	-3,37	0,000349

6. Marcadores DArTs cruzados con la experiencia de RNA-seq.

Tabla S10. Tabla de marcadores DArTs cruzados con los resultados de la experiencia de RNA-seq. En verde genes sobre-expresados en el grupo de plantas estolonantes (RR²⁰¹³), en rojo genes inhibidos en RR²⁰¹³. Ordenados de mayor a menor según su tasa de cambio. En negrita genes con tasa de cambio mayor a 2.

	DArTs	GL	Posición	Gen Fv	Locus	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value	
1	1792735 F 0	+	Fvb2	9553149	gene30069	LOC101311341	Alcohol dehidrogenase	38,39	7,27	31,12	5,278	0,000112
2	100023861 F 0	-	Fvb4	3686602	gene11540	LOC101309238	NRT1/ PTR FAMILY 5.2-like	3,00	0,90	2,10	3,344	0,000379
3	1826390 F 0	+	Fvb2	20610543	gene11094	LOC101292176	Major allergen Pru ar 1-like	45,02	14,82	30,20	3,038	0,000537
4	1836895 F 0	+	Fvb6	3779940	gene22207	LOC101310428	(-)-alpha-pinene synthase-like	23,07	7,71	15,36	2,992	0,000292
5	100018835 F 0	-	Fvb6	33379228	gene10245	LOC101297281	Tricyclic synthase EBOS, chloroplastic-like	8,56	2,90	5,65	2,948	0,000030
6	1802352 F 0	+	Fvb2	10175550	gene01630	LOC101298761	Sin caracterizar	55,07	20,44	34,62	2,693	0,000007
7	1814041 F 0	+	Fvb6	22926039	gene15701		---NA---	1,19	0,51	0,68	2,328	0,000870
8	1814572 F 0	+	Fvb2	20232793	gene10572	LOC101303578	Translocator protein homolog	27,83	12,20	15,63	2,281	0,000800
9	1788846 F 0	-	Fvb4	15427003	gene06557	LOC101312817	UDP-glucuronate 4-epimerase 6-like	203,55	92,17	111,38	2,208	0,000284
10	100023237 F 0	-	Fvb5	4769692	gene06305	LOC105351191	Non-specific phospholipase C6	66,45	31,00	35,45	2,144	0,000094
11	1778843 F 0	+	Fvb2	27028920	gene08608	LOC101292658	L-ascorbate oxidase homolog	319,90	160,12	159,78	1,998	0,000004
12	1787207 F 0	-	Fvb6	10913750	gene09651	LOC101305576	MLO-like protein 3	7,72	4,14	3,59	1,867	0,000370
13	1820000 F 0	+	Fvb4	17101130	gene05894	LOC101305932	Sin caracterizar	66,92	37,41	29,51	1,789	0,000718
14	1795539 F 0	-	Fvb6	38366587	gene25854	LOC101312568	F-box protein at5g07610-like	3,24	1,82	1,42	1,779	0,000180
15	100018067 F 0	+	Fvb2	19101442	gene27831		---NA---	2,45	1,39	1,05	1,756	0,000618
16	1775217 F 0	-	Fvb7	14471466	gene18617	LOC101307637	SUPPRESSOR OF npr1-1, CONSTITUTIVE 1-like	0,91	0,52	0,39	1,748	0,000434
17	1811695 F 0	-	Fvb2	28001501	gene15169	LOC101294913	Probable fructokinase-5	42,07	24,76	17,32	1,700	0,000446
18	1818399 F 0	+	Fvb6	26970963	gene07406		---NA---	3,71	2,51	1,20	1,480	0,000483
19	1806355 F 0	-	Fvb1	64839	gene10163	LOC101306848	Late embryogenesis abundant group 2 isoform 1	130,30	88,45	41,85	1,473	0,000386
20	1776022 F 0	+	Fvb3	27161345	gene28204		Glucan endo- -beta-glucosidase 9-like	22,65	15,60	7,05	1,452	0,000203
21	1790485 F 0	-	Fvb6	23098982	gene05546	LOC101294200	Sin caracterizar	10,11	7,52	2,59	1,345	0,000778
22	1832771 F 0	-	Fvb5	3560360	gene09926	LOC101310702	Dead-box ATP-dependent RNA helicase 20	15,79	12,20	3,59	1,294	0,000632
23	1845329 F 0	-	Fvb2	5941987	gene28254	LOC101293079	Glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase A	10,01	7,78	2,23	1,287	0,000174
24	1778060 F 0	+	Fvb2	26825434	gene26245	LOC101313893	DENN domain and WD repeat-containing protein SCD1-like	3,68	3,30	0,38	1,116	0,000957
25	1820620 F 0	-	Fvb6	26500599	gene06916		---NA---	4,79	5,51	-0,72	-1,151	0,000273
26	1798003 F 0	-	Fvb7	17644698	gene26335	LOC101302111	DNA binding	2,86	3,41	-0,55	-1,193	0,000338
27	100032911 F 0	-	Fvb2	26616531	gene08692	LOC101292864	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase iso2	8,73	11,09	-2,36	-1,270	0,000920
28	100017181 F 0	+	Fvb6	8681501	gene18225	LOC101314103	UNC93-like protein 3	8,93	11,57	-2,64	-1,296	0,000231
29	1841619 F 0	-	Fvb5	3172566	gene32206		---NA---	8,30	11,17	-2,87	-1,346	0,000587
30	1803870 F 0	-	Fvb2	6678282	gene02119	LOC101305705	Probable 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase 5-like	4,57	6,15	-1,59	-1,348	0,000219
31	1803708 F 0	-	Fvb5	11078798	gene08921	LOC101302163	WAT1-related protein	35,27	49,25	-13,98	-1,396	0,000797
32	1772741 F 0	-	Fvb4	16477170	gene06066	LOC101294550	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain A	4,01	5,80	-1,79	-1,447	0,000799
33	1797621 F 0	+	Fvb3	17460457	gene23539	LOC101295590	Glutamic acid-rich protein	38,28	56,16	-17,87	-1,467	0,000025

	DArTs	GL	Posición	Gen Fv	Locus	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value	
34	1819822 F 0	+	Fvb2	13494865	gene23752	LOC101307279	Mechanosensitive ion channel protein 6-like	4,07	6,09	-2,02	-1,495	0,000811
35	1802665 F 0	-	Fvb3	24340393	gene14155	LOC101295495	ACT domain-containing protein ACR9-like	2,37	3,60	-1,22	-1,515	0,000766
36	1788501 F 0	+	Fvb3	16465150	gene19910		---NA---	3,18	4,87	-1,69	-1,532	0,000446
37	1806365 F 0	+	Fvb5	10808943	gene08974	LOC101309446	Endosomal targeting bro1-like domain-containing protein	3,40	5,33	-1,92	-1,565	0,000197
38	1783406 F 0	+	Fvb6	2544968	gene22235	LOC101311490	Bifunctional 3-dehydroquinase dehydratase shikimate	30,61	47,94	-17,34	-1,566	0,000214
39	1790079 F 0	-	Fvb4	10165881	gene23574	LOC101303268	Sin caracterizar	49,42	80,15	-30,73	-1,622	0,000386
40	1800240 F 0	-	Fvb2	16727968	gene08249	LOC101303864	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	4,91	8,15	-3,24	-1,660	0,000178
41	1791567 F 0	+	Fvb3	5111001	gene29728	LOC101299065	Glyoxysomal processing protease	7,73	12,82	-5,10	-1,660	0,000039
42	1788031 F 0	+	Fvb1	9469370	gene24083	LOC101302491	Peroxidase 10-like	0,78	1,30	-0,52	-1,663	0,000369
43	1795660 F 0	-	Fvb3	6008051	gene28941	LOC101309037	Nuclear transcription factor Y subunit A-7	15,74	26,29	-10,55	-1,670	0,000334
44	1834130 F 0	+	Fvb1	18155582	gene24967	LOC101293136	Probable mannitol dehydrogenase	25,06	43,57	-18,50	-1,738	0,000163
45	1849911 F 0	+	Fvb2	16692924	gene08239	LOC101293656	Myosin-16	0,29	0,53	-0,23	-1,799	0,000153
46	1828643 F 0	-	Fvb2	16162937	gene17556	LOC101313770	Putative kinase-like protein TMKL1	8,33	15,07	-6,74	-1,809	0,000001
47	1799807 F 0	-	Fvb3	5060641	gene29738	LOC101314350	Ethylene-responsive transcription factor 4	509,43	928,37	-418,95	-1,822	0,000870
48	1819021 F 0	-	Fvb2	18475805	gene20334	LOC101308545	2-oxoglutarate and fe-dependent oxygenase protein	1,73	3,16	-1,43	-1,824	0,000194
49	1803601 F 0	-	Fvb4	28087729	gene04537	LOC101300819	Prolyl endopeptidase-like	1,56	2,88	-1,31	-1,840	0,000882
50	1777098 F 0	-	Fvb2	14960402	gene17460	LOC101298666	Sin caracterizar	2,06	3,87	-1,81	-1,880	0,000251
51	1772686 F 0	-	Fvb2	26419717	gene08731	LOC101308926	Probable sarcosine oxidase	1,07	2,01	-0,94	-1,882	0,000855
52	1807150 F 0	+	Fvb4	27229178	gene03763	LOC101299177	Sin caracterizar	58,30	120,46	-62,16	-2,066	0,000050
53	1795148 F 0	-	Fvb1	10570334	gene01543	LOC101296047	Sin caracterizar protein ycf36	1,21	2,54	-1,33	-2,100	0,000151
54	1818075 F 0	+	Fvb2	178407	gene26366	LOC101307906	Leucine-rich repeat extensin-like protein 5	85,31	199,14	-113,84	-2,334	0,000004
55	1774032 F 0	-	Fvb7	14650378	gene18590	LOC101291171	ATAF2-like	2,23	5,28	-3,05	-2,368	0,000007
56	1814898 F 0	+	Fvb7	15034623	gene34004	LOC101301531	NAC domain-containing protein 68-like	1,86	4,58	-2,72	-2,463	0,000319
57	1845817 F 0	-	Fvb6	540486	gene16760	LOC101303830	Chromatin remodeling complex subunit	5,21	14,00	-8,79	-2,688	0,000049
58	100010392 F 0	-	Fvb3	24717750	gene13976	LOC101305347	Sin caracterizar	2,35	7,06	-4,71	-3,009	0,000033
59	1812807 F 0	-	Fvb2	10435927	gene01653	LOC101299626	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	5,81	23,41	-17,60	-4,027	0,000658

7. Datos de expresión de los genes con tasas de cambio superiores a 2 en la experiencia de RNA-seq.

Tabla S11. Expresión diferencial de los 710 genes con tasas de cambio mayores a 2, en la experiencia por RNA-seq. En verde genes inducidos en plantas estolonantes, en rojo genes expresión mayor en las plantas no estolonantes.

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
1	gene21257 cyclin-dependent kinase f-4-like	28,24	0,56	27,68	50,83	0,000829
2	gene21256 21 kda	118,58	4,59	113,99	25,83	0,000757
3	gene18872 (-)-germacrene d synthase-like	15,88	0,79	15,09	20,15	0,000021
4	gene08235 ---NA---	0,60	0,03	0,57	20,02	0,000198
5	gene11448 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101298879	190,74	9,75	180,99	19,56	0,000011
6	gene27604 ap2 erf domain-containing transcription factor	136,58	7,42	129,16	18,41	0,000006
7	gene12725 dna repair protein reca-like protein	1,16	0,06	1,10	18,38	0,000418
8	gene08065 hyoscyamine 6-dioxygenase-like	2,14	0,12	2,02	18,28	0,000018
9	gene26152 protein	1,34	0,09	1,25	14,58	0,000217
10	gene23219 protein	25,24	1,79	23,46	14,12	0,000159
11	gene18038 probable carboxylesterase 15-like	11,42	0,81	10,61	14,04	0,000494
12	gene09119 subtilisin-like protease-like	2,32	0,17	2,15	13,90	0,000021
13	gene18341 leucoanthocyanidin dioxygenase	197,28	15,30	181,98	12,90	0,000001
14	gene02231 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	9,49	0,82	8,67	11,63	0,000297
15	gene16486 dna-binding storekeeper transcriptional regulator	1,76	0,16	1,60	11,02	0,000029
16	gene05123 major allergen pru ar 1-like	60,91	5,80	55,11	10,51	0,000150
17	gene24079 patatin group a-3-like	3,56	0,34	3,22	10,40	0,000146
18	gene01857 fe ascorbate oxidase	42,40	4,16	38,25	10,20	0,000158
19	gene08914 aquaporin tip2-3	1,74	0,19	1,56	9,43	0,000215
20	gene07083 major allergen pru ar 1-like	13,35	1,42	11,93	9,38	0,000232
21	gene22789 chorismate synthase	29,52	3,46	26,06	8,53	0,000228
22	gene21091 ap2 erf domain-containing transcription factor	184,75	22,04	162,71	8,38	0,000005
23	gene11450 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101298879	22,32	2,77	19,55	8,05	0,000014
24	gene03735 hypothetical protein PRUPE_ppa013354mg	108,90	13,63	95,27	7,99	0,000503
25	gene15749 cucumber peeling cupredoxin-like	121,62	15,29	106,34	7,96	0,000256
26	gene07066 mal d	165,62	21,26	144,36	7,79	0,000025
27	gene19524 protein	0,54	0,07	0,47	7,62	0,000978
28	gene21044 abscisic acid receptor pyl4-like	24,19	3,27	20,92	7,39	0,000033
29	gene24330 udp-glycosyltransferase 82a1-like	49,80	7,05	42,75	7,06	0,000017
30	gene11945 udp-glycosyltransferase 85a2-like	19,54	2,79	16,75	7,01	0,000054
31	gene11423 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101315183	1,28	0,18	1,10	6,99	0,000983
32	gene16497 myosin-h heavy chain isoform 1	5,55	0,79	4,75	6,98	0,000036
33	gene23656 ---NA---	2,06	0,30	1,76	6,80	0,000094

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value	
34	gene05981	f-box kelch-repeat protein at1g80440-like	11,99	1,80	10,18	6,65	0,000431
35	gene07064	major allergen pru ar 1-like	113,05	17,48	95,57	6,47	0,000910
36	gene20980	leucoanthocyanidin dioxygenase	17,62	2,74	14,88	6,43	0,000037
37	gene34207	cytosolic sulfotransferase 15-like	701,70	109,65	592,05	6,40	0,000044
38	gene07084	major allergen pru ar 1-like	77,38	12,49	64,89	6,19	0,000645
39	gene05802	phytosulfokines 3-like	83,55	13,64	69,91	6,12	0,000020
40	gene17102	zinc finger	77,15	12,86	64,29	6,00	0,000626
41	gene18721	peptide nitrate transporter at2g37900-like	14,64	2,45	12,19	5,98	0,000382
42	gene13194	acidic endochitinase-like	4,27	0,72	3,54	5,90	0,000037
43	gene07063	mal d	389,85	66,35	323,50	5,88	0,000049
44	gene26238	plac8 family protein	8,89	1,56	7,33	5,69	0,000093
45	gene27898	protein	28,35	4,99	23,36	5,68	0,000226
46	gene22227	---NA---	5,39	0,97	4,42	5,56	0,000710
47	gene05580	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	0,78	0,14	0,64	5,44	0,000590
48	gene07065	mal d	842,06	159,46	682,60	5,28	0,000008
49	gene30069	alcohol dehydrogenase	38,39	7,27	31,12	5,28	0,000112
50	gene05185	major allergen mal d	731,02	140,35	590,67	5,21	0,000738
51	gene17430	transcription factor bhlh62-like	26,51	5,19	21,31	5,10	0,000096
52	gene05122	mal d	143,26	29,07	114,19	4,93	0,000219
53	gene20098	patatin group a-3-like	31,33	6,40	24,93	4,90	0,000332
54	gene13070	amp dependent	1,93	0,40	1,53	4,88	0,000316
55	gene18464	l-type lectin-domain containing receptor kinase -like	12,00	2,50	9,50	4,80	0,000026
56	gene31078	blue copper protein	11,41	2,38	9,03	4,79	0,000316
57	gene07088	mal d	161,50	34,77	126,73	4,65	0,000049
58	gene21249	pectinesterase 2-like	2,92	0,63	2,29	4,61	0,000505
59	gene32362	phospholipase d beta 1-like	11,56	2,54	9,02	4,55	0,000047
60	gene10984	---NA---	13,81	3,05	10,76	4,53	0,000424
61	gene03135	(-)-germacrene d synthase	25,57	5,70	19,87	4,48	0,000498
62	gene27835	xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein precursor	14,03	3,17	10,87	4,43	0,000018
63	gene25624	early nodulin-like protein 1-like	1,30	0,30	1,00	4,37	0,000189
64	gene27856	endo- -beta-d-glucanase-like	13,32	3,06	10,26	4,35	0,000034
65	gene10447	bahd acyltransferase at5g47980-like	49,14	11,31	37,84	4,35	0,000075
66	gene11421	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like	162,68	37,59	125,08	4,33	0,000589
67	gene12202	---NA---	27,51	6,47	21,05	4,26	0,000091
68	gene14627	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101294799	0,78	0,19	0,59	4,20	0,000047
69	gene05408	chaperone protein dnaj	24,91	5,96	18,95	4,18	0,000015
70	gene23327	pb1_up2 domain-containing protein	4,90	1,18	3,73	4,17	0,000153
71	gene19831	oligopeptide transporter 3-like	70,32	16,89	53,43	4,16	0,000007
72	gene05936	basic 7s globulin 2 precursor small	4,50	1,08	3,42	4,16	0,000686
73	gene22788	chorismate synthase	3,66	0,89	2,77	4,13	0,000380

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
74	gene12726 mechanosensitive ion channel protein 10-like	49,62	12,11	37,50	4,10	0,000004
75	gene24392 gibberellin 2-beta-dioxygenase 2-like	7,49	1,84	5,65	4,06	0,000998
76	gene30965 sesquiterpene synthase	194,51	48,08	146,44	4,05	0,000561
77	gene03134 (-)-germacrene d synthase	64,45	15,93	48,51	4,04	0,000592
78	gene27512 benzyl alcohol o-benzoyltransferase-like	72,87	18,37	54,50	3,97	0,000046
79	gene16896 protein	2,76	0,70	2,06	3,95	0,000800
80	gene01025 disease resistance protein rpm1-like	2,12	0,54	1,58	3,95	0,000230
81	gene04288 transcription initiation factor iib	2,37	0,60	1,76	3,94	0,000326
82	gene10629 probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 41-like	39,76	10,19	29,58	3,90	0,000783
83	gene18053 ---NA---	87,35	22,53	64,83	3,88	0,000317
84	gene32346 transcription factor bhlh120-like	4,75	1,23	3,53	3,87	0,000088
85	gene22074 #iREF!	171,15	44,23	126,93	3,87	0,000019
86	gene12563 inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 1-like	347,73	90,04	257,69	3,86	0,000002
87	gene12738 transcription factor tt2-like	6,52	1,71	4,81	3,81	0,000101
88	gene30638 ark3	8,25	2,17	6,08	3,81	0,000123
89	gene30434 polyphenol oxidase	83,91	22,07	61,84	3,80	0,000028
90	gene13837 cationic peroxidase 1-like	87,42	23,01	64,41	3,80	0,000157
91	gene26497 cytochrome p450 71a4-like	4,06	1,09	2,97	3,71	0,000069
92	gene34453 cytochrome p450 71a4-like	23,44	6,35	17,09	3,69	0,000040
93	gene07756 udp-glycosyltransferase 1	0,89	0,24	0,65	3,68	0,000452
94	gene00852 gibberellin 2-beta-dioxygenase 8-like	7,60	2,07	5,54	3,68	0,000000
95	gene28509 protein kinase	2,72	0,74	1,98	3,68	0,000509
96	gene15793 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101313135	9,48	2,59	6,89	3,66	0,000525
97	gene05980 f-box kelch-repeat protein at1g80440-like	16,08	4,41	11,66	3,64	0,000070
98	gene25402 ribonuclease h protein at1g65750-like	3,95	1,09	2,87	3,64	0,000412
99	gene09137 ap2 erf domain-containing transcription factor	6,42	1,77	4,66	3,64	0,000216
100	gene26499 cytochrome p450 71a25-like	68,60	18,89	49,72	3,63	0,000397
101	gene04962 major allergen mal d	287,18	79,06	208,12	3,63	0,000155
102	gene08209 ribonuclease h protein at1g65750-like	6,67	1,84	4,84	3,63	0,000541
103	gene24432 non-structural maintenance of chromosome element 4-like	3,64	1,00	2,63	3,63	0,000015
104	gene15752 cucumber peeling cupredoxin-like	94,18	26,08	68,11	3,61	0,000335
105	gene18544 ef- calcium binding motif-containing protein	0,76	0,21	0,55	3,61	0,000924
106	gene26481 cytochrome p450	4,77	1,33	3,44	3,59	0,000137
107	gene28954 cationic amino acid transporter	16,28	4,54	11,74	3,58	0,000006
108	gene06337 cytochrome p450 94a1-like	20,05	5,60	14,45	3,58	0,000916
109	gene27436 probable s-acyltransferase at4g24630-like	1,21	0,34	0,87	3,56	0,000671
110	gene18802 probable anion transporter chloroplastic-like	14,20	4,00	10,20	3,55	0,000436
111	gene28862 wall-associated receptor kinase 2-like	5,09	1,44	3,66	3,55	0,000081
112	gene10136 udp-glycosyltransferase 74e1-like	17,01	4,81	12,20	3,54	0,000255

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
113	gene34534 tyrosine-sulfated glycopeptide receptor 1-like	10,98	3,11	7,87	3,53	0,000700
114	gene14290 #iREF!	0,67	0,19	0,48	3,52	0,000727
115	gene09672 probable xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 32-like	60,77	17,28	43,50	3,52	0,000255
116	gene11519 peroxisomal membrane protein pmp22-like	4,15	1,18	2,97	3,51	0,000634
117	gene32574 #iREF!	1,34	0,38	0,96	3,50	0,000575
118	gene08627 uncharacterized loc101207424	15,04	4,31	10,73	3,49	0,000033
119	gene12115 dna-binding protein escarola-like	168,72	48,38	120,35	3,49	0,000269
120	gene31337 gibberellin 2-oxidase	49,18	14,29	34,89	3,44	0,000416
121	gene25905 triacylglycerol lipase 2-like	4,58	1,34	3,25	3,42	0,000010
122	gene30373 endoplasmic oxidoreductin-1-like	46,54	13,62	32,91	3,42	0,000144
123	gene26253 hypothetical protein PRUPE_ppa024136mg, partial	4,51	1,32	3,18	3,41	0,000140
124	gene05374 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101314483	22,46	6,61	15,85	3,40	0,000225
125	gene11422 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101315183	2,71	0,80	1,91	3,39	0,000254
126	gene35178 atp-citrate synthase	111,14	32,82	78,32	3,39	0,000052
127	gene23190 atp binding	2,68	0,79	1,89	3,38	0,000270
128	gene03931 ---NA---	2,71	0,80	1,91	3,37	0,000360
129	gene03344 actin cytoskeleton-regulatory complex protein isoform 1	133,53	39,81	93,72	3,35	0,000358
130	gene11540 peptide transporter ptr3-a-like	3,00	0,90	2,10	3,34	0,000379
131	gene05904 protein	60,58	18,15	42,43	3,34	0,000041
132	gene31706 ---NA---	70,33	21,07	49,26	3,34	0,000606
133	gene24153 ---NA---	11,21	3,36	7,84	3,33	0,000029
134	gene32247 acid invertase	9,42	2,83	6,59	3,33	0,000427
135	gene31967 cytochrome p450	78,45	23,79	54,66	3,30	0,000280
136	gene09536 ---NA---	2,89	0,88	2,01	3,29	0,000301
137	gene22172 farnesyl diphosphate synthase	28,91	8,85	20,07	3,27	0,000042
138	gene17835 protein	8,67	2,66	6,01	3,26	0,000314
139	gene09653 mlo-like protein 6-like	2,74	0,84	1,90	3,25	0,000514
140	Gene 490 #N/A	1,59	0,49	1,10	3,25	0,000347
141	gene19848 farnesyl diphosphate synthase	326,26	100,79	225,47	3,24	0,000082
142	gene08257 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	21,52	6,65	14,87	3,23	0,000123
143	Gene 158 #N/A	20,97	6,49	14,49	3,23	0,000324
144	gene08518 gibberellin-regulated protein	8,07	2,50	5,57	3,23	0,000631
145	gene09571 probable peptide nitrate transporter at5g62680-like	1,73	0,54	1,20	3,22	0,000032
146	gene05820 phosphate metabolism protein	24,81	7,73	17,08	3,21	0,000028
147	gene08555 kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like isoform 1	1,67	0,52	1,15	3,21	0,000359
148	gene08873 ethylene-responsive transcription factor erf034-like	2,05	0,64	1,41	3,20	0,000098
149	gene25685 myb-like transcription factor 1	24,60	7,69	16,91	3,20	0,000218
150	gene23095 abc transporter c family member 8-like	2,13	0,67	1,46	3,18	0,000005
151	Gene 140 #N/A	1259,95	399,60	860,35	3,15	0,000046
152	gene00868 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101303230	2,67	0,85	1,82	3,15	0,000837

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
153	gene16729 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101300926	27,06	8,62	18,44	3,14	0,000009
154	gene27645 ---NA---	16,48	5,27	11,21	3,13	0,000421
155	gene18929 gibberellin 20	66,58	21,34	45,24	3,12	0,000147
156	gene26505 #jREF!	2,92	0,94	1,99	3,12	0,000004
157	gene12032 ring-h2 finger protein at11-like	17,69	5,69	12,01	3,11	0,000317
158	gene08018 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101291972	144,72	46,70	98,02	3,10	0,000002
159	gene13273 shortage in chiasmata 1	8,07	2,61	5,46	3,09	0,000572
160	gene19379 tir-nbs-lrr resistance protein	1,55	0,50	1,05	3,09	0,000819
161	gene18555 g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase rlk1-like	1,41	0,46	0,95	3,09	0,000635
162	gene03269 (-)-germacrene d synthase-like	3,79	1,23	2,55	3,07	0,000459
163	gene27220 ---NA---	0,72	0,23	0,48	3,07	0,000590
164	gene26536 udp-glycosyltransferase 91c1-like	2,10	0,69	1,41	3,05	0,000602
165	gene00592 wall-associated receptor kinase-like 10-like	14,56	4,78	9,78	3,05	0,000218
166	gene11094 major allergen pru ar 1-like	45,02	14,82	30,20	3,04	0,000537
167	gene31972 late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycofamily	1,82	0,60	1,22	3,04	0,000477
168	gene13099 #jREF!	17,74	5,87	11,87	3,02	0,000972
169	gene08820 bark storage protein a-like	63,67	21,08	42,58	3,02	0,000018
170	gene00684 #jREF!	0,84	0,28	0,56	3,02	0,000211
171	gene16409 retrotransposon ty1-copia subclass	0,62	0,20	0,41	3,02	0,000495
172	gene08258 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	117,36	38,98	78,38	3,01	0,000122
173	gene27141 ---NA---	1047,44	348,38	699,06	3,01	0,000034
174	gene20574 pentatricopeptide repeat-containing protein mitochondrial-like	5,16	1,72	3,44	3,00	0,000195
175	gene22207 (-)-alpha-pinene synthase-like	23,07	7,71	15,36	2,99	0,000292
176	gene09970 cytochrome p450 71a1-like	6,01	2,01	4,00	2,99	0,000011
177	gene19476 mitogen-activated protein kinase kinase kinase a-like	3,00	1,00	2,00	2,99	0,000012
178	gene13147 acidic endochitinase-like	0,67	0,23	0,45	2,97	0,000572
179	gene00590 wall-associated receptor kinase-like 10-like	57,24	19,35	37,89	2,96	0,000242
180	gene26354 udp-glucose flavonoid 3-o-glucosyltransferase 7-like	7,41	2,51	4,91	2,96	0,000603
181	gene10776 protein srg1-like	379,62	128,45	251,17	2,96	0,000046
182	gene10245 tricyclene synthase chloroplastic-like	8,56	2,90	5,65	2,95	0,000030
183	gene21202 aldo-keto reductase family 4 member c9-like	2,42	0,82	1,60	2,94	0,000406
184	gene20556 stachyose synthase	22,13	7,54	14,60	2,94	0,000530
185	gene15032 zinc finger	17,17	5,90	11,27	2,91	0,000101
186	gene08866 upf0481 protein at3g47200-like	11,78	4,05	7,73	2,91	0,000013
187	gene29945 saur family protein	27,79	9,58	18,22	2,90	0,000268
188	gene34321 wall-associated receptor kinase-like 9-like	2,57	0,89	1,68	2,90	0,000998
189	gene33825 wall-associated receptor kinase-like 10-like	55,62	19,24	36,38	2,89	0,000031
190	gene05590 homeobox-leucine zipper protein hat22-like	69,41	24,05	45,36	2,89	0,000029
191	gene30369 f-box family protein	69,63	24,13	45,50	2,89	0,000414

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
192	gene29781 udp-glycosyltransferase 79b6-like	19,66	6,82	12,83	2,88	0,000814
193	gene23653 germin-like protein subfamily 3 member 2-like	27,54	9,66	17,88	2,85	0,000150
194	gene13148 g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase at5g24080-like	0,77	0,27	0,50	2,84	0,000602
195	gene00708 udp-glycosyltransferase 74b1-like	11,67	4,11	7,56	2,84	0,000091
196	gene 532 ---NA---	9,98	3,52	6,46	2,83	0,000628
197	gene21165 ethylene response factor	165,04	58,57	106,48	2,82	0,000309
198	gene13068 probable acyl-activating enzyme peroxisomal-like	3,43	1,22	2,21	2,81	0,000010
199	gene23657 diphosphomevalonate decarboxylase-like	291,24	103,77	187,48	2,81	0,000002
200	gene15994 vq motif-containing protein	23,16	8,27	14,89	2,80	0,000332
201	gene10192 hypothetical protein PRUPE_ppb021676mg	22,12	7,97	14,16	2,78	0,000927
202	gene12105 pectinesterase	62,85	22,84	40,01	2,75	0,000132
203	gene31899 dna binding	65,27	23,72	41,55	2,75	0,000056
204	gene23034 beta- insoluble isoenzyme cwinv1-like	19,85	7,23	12,62	2,74	0,000182
205	gene32059 uncharacterized membrane	17,06	6,22	10,84	2,74	0,000014
206	gene18970 glutamine amidotransferase ylr126c-like	3,98	1,45	2,53	2,74	0,000893
207	gene21424 receptor-like protein	5,17	1,89	3,27	2,73	0,000487
208	gene05118 #iREF!	214,38	78,59	135,78	2,73	0,000010
209	gene11903 e3 ubiquitin-protein ligase mib1-like	0,72	0,27	0,46	2,73	0,000219
210	gene15533 acetyl- c-acetyltransferase	801,18	294,81	506,37	2,72	0,000011
211	gene10633 #iREF!	25,58	9,42	16,16	2,71	0,000012
212	gene31070 ankyrin repeat-containing protein at3g12360-like	11,21	4,13	7,08	2,71	0,000105
213	gene17260 retrotransposon unclassified	1,20	0,44	0,76	2,71	0,000147
214	gene01630 #iREF!	55,07	20,44	34,62	2,69	0,000007
215	gene30452 hypothetical protein PRUPE_ppa017579mg	18,04	6,73	11,30	2,68	0,000267
216	gene14601 thaumatin-like protein 1-like	13,46	5,03	8,43	2,68	0,000024
217	gene29048 hat family dimerization domain containing protein	8,68	3,25	5,42	2,67	0,000079
218	gene20435 ---NA---	1,05	0,39	0,66	2,66	0,000095
219	gene25995 disease resistance protein at4g27190-like	0,98	0,37	0,61	2,65	0,000602
220	gene32370 #iREF!	270,96	102,25	168,72	2,65	0,000025
221	gene15488 endoglucanase 16-like	21,48	8,12	13,36	2,64	0,000200
222	gene04876 blue copper	1,30	0,49	0,81	2,64	0,000466
223	gene03406 mitogen-activated protein kinase kinase kinase a-like	4,44	1,69	2,75	2,63	0,000864
224	gene24713 calcium-dependent lipid-binding family protein	512,01	194,69	317,32	2,63	0,000179
225	gene27526 low quality protein: laccase-15- partial	131,47	50,11	81,35	2,62	0,000045
226	gene25128 probable serine threonine-protein kinase at1g18390-like	9,17	3,50	5,67	2,62	0,000589
227	gene23281 ---NA---	6,51	2,49	4,02	2,61	0,000140
228	gene27779 predicted protein	155,91	59,96	95,95	2,60	0,000193
229	gene04517 amino acid transporter	12,36	4,79	7,57	2,58	0,000019
230	gene00665 interferon-induced gtp-binding protein	26,37	10,25	16,12	2,57	0,000019
231	gene18466 l-type lectin-domain containing receptor kinase -like	12,81	5,01	7,80	2,56	0,000450

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
232	gene21260 21 kda	1331,69	521,20	810,49	2,56	0,000225
233	gene23101 pyridoxal phosphate phosphatase phospho2	14,58	5,73	8,85	2,55	0,000151
234	gene13545 myb family transcription factor apl-like	10,71	4,23	6,47	2,53	0,000248
235	gene06015 pleiotropic drug resistance protein 1-like	0,94	0,37	0,57	2,51	0,000260
236	gene20625 #iREF!	4,79	1,91	2,89	2,51	0,000019
237	gene14942 protein	76,27	30,41	45,86	2,51	0,000042
238	gene23873 ap2 erf domain-containing transcription factor	15,18	6,06	9,13	2,51	0,000784
239	gene23339 cdp-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase-like	29,02	11,60	17,41	2,50	0,000030
240	gene14789 f-box protein at5g07610-like	31,42	12,58	18,84	2,50	0,000461
241	gene30156 trihelix transcription factor gt-2-like	12,84	5,15	7,69	2,49	0,000072
242	gene30929 pinus taeda anonymous locus 0_12440_01 genomic sequence	64,56	25,98	38,58	2,49	0,000334
243	gene30357 inorganic pyrophosphatase 2-like	5,76	2,33	3,43	2,47	0,000223
244	gene18720 galactose oxidase-like	30,78	12,45	18,33	2,47	0,000544
245	gene08791 ribonuclease h protein at1g65750-like	6,98	2,82	4,16	2,47	0,000225
246	gene20041 uncharacterized loc101219184	1,36	0,55	0,81	2,47	0,000663
247	gene29784 udp-glycosyltransferase 79b6-like	113,50	45,97	67,54	2,47	0,000265
248	gene21443 #iREF!	1,45	0,59	0,86	2,47	0,000201
249	gene04284 alpha beta fold family protein	10,66	4,34	6,32	2,45	0,000867
250	gene21621 fimbrin-like protein 2-like	3,87	1,58	2,29	2,45	0,000137
251	gene30059 protein binding protein	11,94	4,91	7,03	2,43	0,000172
252	gene04179 protein glutamine dumper 1-like	6,58	2,71	3,87	2,43	0,000001
253	gene08537 chaperone protein dnaj chloroplastic-like	49,90	20,56	29,35	2,43	0,000209
254	gene31045 ein3-binding f-box protein 1-like	51,08	21,05	30,03	2,43	0,000474
255	gene26163 protease 4-like	4,11	1,70	2,41	2,42	0,000568
256	gene22562 uncharacterized loc101212067	366,67	152,34	214,34	2,41	0,000004
257	gene25414 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101309518	403,09	167,64	235,45	2,40	0,000306
258	gene19727 calcium-transporting atpase plasma membrane-type-like	27,71	11,53	16,18	2,40	0,000125
259	gene10649 beta-amylase chloroplastic-like	11,06	4,62	6,44	2,40	0,000047
260	gene02350 wall-associated receptor kinase 2-like	9,30	3,90	5,40	2,38	0,000395
261	gene04524 udp-glycosyltransferase 89a2-like	35,21	14,77	20,44	2,38	0,000796
262	gene19766 acyl- --sterol o-acyltransferase 1-like	0,62	0,26	0,36	2,38	0,000021
263	gene21164 ---NA---	6,02	2,53	3,49	2,38	0,000229
264	gene13136 acidic endochitinase	1,61	0,68	0,93	2,37	0,000589
265	gene19600 protein transparent testa 12-like	7,32	3,09	4,23	2,37	0,000001
266	gene08260 methyltransferase pmt8	106,70	45,02	61,67	2,37	0,000014
267	gene13126 abc transporter c family member 10-like	7,77	3,28	4,49	2,37	0,000121
268	gene26678 uncharacterized membrane	4,57	1,93	2,64	2,36	0,000082
269	gene20062 baculoviral iap repeat-containing protein	28,19	11,94	16,24	2,36	0,000010
270	gene16521 cation calcium exchanger 2-like	21,03	8,92	12,11	2,36	0,000164

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
271	gene26646 carnitine isoform 1	15,66	6,65	9,01	2,36	0,000029
272	gene12693 pentatricopeptide repeat-containing protein	12,87	5,47	7,39	2,35	0,000480
273	gene14993 monogalactosyldiacylglycerol synthase	15,08	6,42	8,66	2,35	0,000032
274	gene10961 probable calcium-binding protein cml44-like	12,36	5,28	7,08	2,34	0,000312
275	gene14642 uncharacterized loc101216872	18,30	7,82	10,48	2,34	0,000345
276	gene13533 udp-glycosyltransferase 73c5-like	602,76	257,72	345,04	2,34	0,000101
277	gene03345 probable beta- -galactosyltransferase 2-like	34,79	14,90	19,89	2,34	0,000035
278	gene32532 ethylene receptor 2-like	123,45	52,90	70,56	2,33	0,000335
279	gene09678 major facilitator superfamily protein	9,84	4,22	5,62	2,33	0,000623
280	gene15701 ---NA---	1,19	0,51	0,68	2,33	0,000870
281	gene04510 protein	8,67	3,73	4,94	2,33	0,000010
282	gene07045 pectinesterase pectinesterase inhibitor 28-like	6,92	2,98	3,94	2,32	0,000577
283	gene14947 udp-rhamnose:rhamnosyltransferase 1-like	36,35	15,69	20,66	2,32	0,000188
284	gene20022 probable polygalacturonase-like	3,06	1,32	1,74	2,31	0,000076
285	gene01753 glabra2 expression modulator-like	15,14	6,55	8,60	2,31	0,000063
286	gene01430 uncharacterized loc101208094	26,31	11,43	14,89	2,30	0,000709
287	gene 135 ---NA---	3,47	1,51	1,96	2,30	0,000301
288	gene22623 ---NA---	0,87	0,38	0,49	2,30	0,000646
289	gene03446 o-glycosyl hydrolases family 17 protein	55,39	24,13	31,26	2,30	0,000281
290	gene06738 casp-like protein 6-like	13,03	5,69	7,34	2,29	0,000178
291	gene25804 udp-glycosyltransferase 79b6-like	0,69	0,30	0,39	2,29	0,000674
292	gene13851 af4 fmr2 family member 1	15,24	6,68	8,57	2,28	0,000537
293	gene10572 translocator protein homolog	27,83	12,20	15,63	2,28	0,000800
294	gene30685 protein	101,17	44,38	56,79	2,28	0,000520
295	gene30433 polyphenol oxidase	542,55	238,00	304,55	2,28	0,000046
296	gene17296 cytochrome p450	10,17	4,48	5,69	2,27	0,000335
297	gene30392 remorin family protein	38,79	17,09	21,70	2,27	0,000011
298	gene12965 probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 12-like	67,38	29,68	37,70	2,27	0,000017
299	gene25994 ---NA---	6,00	2,64	3,36	2,27	0,000428
300	gene05722 lob domain-containing protein 38-like	126,63	55,81	70,82	2,27	0,000447
301	gene31270 cbs domain-containing protein cbsx5-like	85,41	37,71	47,70	2,27	0,000312
302	gene21171 had subfamily iiib acid phosphatase	15,96	7,08	8,88	2,26	0,000230
303	gene16810 isopentenyl diphosphate isomerase	697,39	309,38	388,01	2,25	0,000180
304	gene29029 atp sulfurylase	130,96	58,18	72,78	2,25	0,000049
305	gene03967 copii coat assembly protein sec16	23,08	10,28	12,80	2,24	0,000069
306	gene06579 protein ralf-like 32-like	122,62	54,69	67,93	2,24	0,000425
307	gene19110 elicitor-responsive protein	88,01	39,26	48,75	2,24	0,000020
308	gene13258 cytochrome p450	37,10	16,55	20,54	2,24	0,000722
309	gene18171 xylosyltransferase 1-like	46,13	20,58	25,54	2,24	0,000164
310	gene22519 probable linoleate 9s-lipoxygenase 5-like	80,27	35,88	44,38	2,24	0,000011



Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
311	gene13450 hsp70-binding protein 1-like	45,56	20,41	25,16	2,23	0,000234
312	gene10098 hva22 isoform 3	25,36	11,39	13,97	2,23	0,000729
313	gene09731 casp-like protein 2-like	11,49	5,16	6,33	2,23	0,000000
314	gene16947 syntaxin family protein	31,30	14,06	17,24	2,23	0,000100
315	gene14488 aspartic proteinase-like protein 2-like	15,42	6,94	8,47	2,22	0,000030
316	gene02343 wall-associated receptor kinase 2-like	3,80	1,72	2,09	2,21	0,000483
317	gene19493 #iREF!	147,65	66,76	80,89	2,21	0,000335
318	gene06557 udp-glucuronate 4-epimerase 6-like	203,55	92,17	111,38	2,21	0,000284
319	gene08288 long-chain-alcohol oxidase fao2-like	11,57	5,24	6,33	2,21	0,000391
320	gene31130 protein	11,34	5,17	6,17	2,19	0,000034
321	gene21449 ---NA---	9,79	4,47	5,32	2,19	0,000181
322	gene26858 dna-directed rna polymerase iii subunit rpc2-like	2,23	1,02	1,21	2,19	0,000593
323	gene25778 diacylglycerol kinase 1-like	37,42	17,10	20,32	2,19	0,000104
324	gene21862 ---NA---	0,89	0,41	0,48	2,19	0,000830
325	gene13484 ammonium transporter 2-like	45,21	20,75	24,46	2,18	0,000358
326	gene08913 1-phosphatidylinositol-2-bisphosphate phosphodiesterase delta-1	14,88	6,84	8,04	2,17	0,000340
327	gene07455 atp-dependent rna helicase mitochondrial-like	185,82	85,48	100,34	2,17	0,000021
328	gene27168 #iREF!	191,82	88,43	103,39	2,17	0,000038
329	gene12924 cysteine and histidine-rich protein	14,81	6,83	7,98	2,17	0,000110
330	gene10571 bifunctional epoxide hydrolase 2-like	75,65	34,89	40,76	2,17	0,000204
331	gene02056 ---NA---	109,36	50,48	58,88	2,17	0,000741
332	gene17742 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101292530	19,33	8,93	10,41	2,17	0,000104
333	gene01228 probable disease resistance protein at5g66900-like	3,46	1,61	1,85	2,15	0,000279
334	gene29478 tetraketide alpha-pyrone reductase 1-like	6,79	3,16	3,63	2,15	0,000452
335	gene06305 phospholipase c 3-like	66,45	31,00	35,45	2,14	0,000094
336	gene28057 benzyl alcohol o-benzoyltransferase	109,38	51,08	58,30	2,14	0,000360
337	gene01894 dna binding	347,12	162,53	184,58	2,14	0,000670
338	gene30398 uncharacterized membrane	442,80	207,47	235,33	2,13	0,000094
339	gene11882 dehydration-responsive element-binding protein 3-like	120,81	56,97	63,84	2,12	0,000037
340	gene25294 lob domain-containing protein 1-like	8,21	3,88	4,34	2,12	0,000712
341	gene05424 zinc finger	401,21	189,71	211,49	2,11	0,000212
342	gene33903 wall-associated receptor kinase 2-like	14,04	6,64	7,40	2,11	0,000157
343	gene08573 thioredoxin superfamily protein	23,52	11,14	12,38	2,11	0,000683
344	gene17114 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase	238,38	113,46	124,93	2,10	0,000422
345	gene01296 xylosyltransferase 1-like	19,52	9,29	10,23	2,10	0,000017
346	gene00690 trichome birefringence-like 27	39,41	18,78	20,63	2,10	0,000018
347	gene23953 glycine-rich cell wall structural protein 1	164,54	78,42	86,13	2,10	0,000220
348	Gene 206 #N/A	5,54	2,64	2,90	2,10	0,000819
349	gene08625 probable serine threonine-protein kinase at4g35230-like	65,72	31,41	34,32	2,09	0,000009

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
350	gene21429 receptor-like protein	4,35	2,08	2,27	2,09	0,000120
351	gene30427 ---NA---	33,25	15,92	17,34	2,09	0,000013
352	gene18328 hypothetical protein PRUPE_ppa010582mg	2,15	1,03	1,12	2,09	0,000308
353	gene13699 phosphomevalonate kinase	38,38	18,39	20,00	2,09	0,000009
354	gene12854 spermidine synthase 3 isoform 3	137,30	65,86	71,44	2,08	0,000068
355	gene02140 o-acyltransferase wsd1-like	17,21	8,28	8,93	2,08	0,000083
356	gene24820 protein	46,40	22,38	24,02	2,07	0,000143
357	gene12692 mitogen-activated protein kinase kinase 2-like	44,97	21,71	23,26	2,07	0,000066
358	gene06319 f-box protein at1g67340-like	33,56	16,21	17,36	2,07	0,000102
359	gene18986 class iii chitinase	40,12	19,47	20,65	2,06	0,000055
360	gene28933 calcium-transporting atpase plasma membrane-type-like	8,88	4,31	4,57	2,06	0,000577
361	gene02277 calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein	60,80	29,54	31,26	2,06	0,000009
362	gene19534 atp binding	3,93	1,91	2,02	2,06	0,000066
363	gene03040 crooked neck-like protein 1-like	14,43	7,02	7,41	2,06	0,000788
364	gene11253 tmv resistance protein n-like	16,55	8,05	8,49	2,05	0,000013
365	gene14264 protein	19,38	9,43	9,94	2,05	0,000119
366	gene23226 lob domain-containing protein 1-like	1,91	0,93	0,98	2,05	0,000570
367	gene00168 hypothetical protein PRUPE_ppa023697mg	12,32	6,02	6,31	2,05	0,000307
368	gene08744 ras guanine nucleotide exchange factor k	12,43	6,07	6,36	2,05	0,000715
369	gene12683 lycopene epsilon cyclase	2,04	0,99	1,04	2,05	0,000210
370	gene05305 glycine-rich rna-binding protein mitochondrial-like	1,91	0,93	0,97	2,04	0,000714
371	gene28245 endonuclease or glycosyl hydrolase	9,97	4,88	5,09	2,04	0,000643
372	gene01302 atp binding	43,46	21,30	22,16	2,04	0,000126
373	gene01897 #iREF!	14,65	7,18	7,46	2,04	0,000003
374	gene27923 #iREF!	7,35	3,61	3,74	2,04	0,000162
375	gene27873 hypothetical protein PRUPE_ppa023126mg	7,43	3,65	3,78	2,04	0,000110
376	gene09603 4-coumarate-- ligase-like 7-like	7,68	3,78	3,91	2,03	0,000014
377	gene20207 wall-associated receptor kinase 2-like	6,97	3,45	3,52	2,02	0,000106
378	gene17396 ---NA---	2,50	1,24	1,26	2,02	0,000420
379	gene24102 #iREF!	5,69	2,82	2,87	2,02	0,000012
380	gene03871 ap2 erf and b3 domain-containing transcription repressor tem1-like	371,33	184,51	186,82	2,01	0,000224
381	gene09510 transcription factor myb1r1-like	26,81	13,34	13,47	2,01	0,000462
382	gene19845 u-box domain-containing protein 35-like	3,36	1,67	1,69	2,01	0,000633
383	gene30810 serine-rich protein	88,99	44,29	44,70	2,01	0,000164
384	gene05277 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101303247	45,57	22,71	22,86	2,01	0,000209
385	gene08955 vesicle-associated protein 1-2-like	29,09	14,50	14,59	2,01	0,000022
386	Gene 253 #N/A	16,42	8,19	8,24	2,01	0,000181
387	gene24329 otu-like cysteine protease family protein	7,20	3,59	3,61	2,00	0,000197
388	gene19641 dna binding	3,15	1,57	1,58	2,00	0,000400
389	gene22974 s-adenosylmethionine synthetase	2808,10	1402,57	1405,53	2,00	0,000092

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
390	gene07912 atp-dependent clp protease atp-binding subunit clp	6,91	13,83	-6,92	-2,00	0,000161
391	gene09620 udp-glycosyltransferase 86a1-like	3,40	6,82	-3,41	-2,00	0,000409
392	gene09285 rhodanese-like domain-containing protein chloroplastic-like	1,87	3,75	-1,88	-2,00	0,000566
393	gene24730 f-box lrr-repeat protein 20-like	0,26	0,52	-0,26	-2,00	0,000091
394	gene01275 glucan -beta-glucosidase	59,15	118,61	-59,46	-2,01	0,000778
395	gene28374 auxin-induced protein 5ng4-like	5,08	10,18	-5,11	-2,01	0,000829
396	gene15996 #iREF!	6,51	13,07	-6,56	-2,01	0,000209
397	gene20045 cytochrome c6	2,34	4,70	-2,36	-2,01	0,000019
398	gene23563 red chlorophyll catabolite reductase	2,70	5,42	-2,73	-2,01	0,000391
399	gene32373 #iREF!	1,55	3,11	-1,56	-2,01	0,000460
400	gene00174 #iREF!	2,11	4,25	-2,14	-2,01	0,000010
401	gene32437 #iREF!	1,21	2,43	-1,22	-2,01	0,000539
402	gene12823 thylakoid lumenal kda chloroplastic-like	1,89	3,81	-1,92	-2,02	0,000695
403	gene29710 transcriptional repressor	1,52	3,08	-1,55	-2,02	0,000432
404	gene26279 probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at4g37250-like	4,75	9,59	-4,84	-2,02	0,000477
405	gene18637 d-arabinono- -lactone oxidase family protein	0,94	1,90	-0,96	-2,02	0,000193
406	gene26018 geranylgeranyl diphosphate chloroplastic-like	9,85	19,90	-10,05	-2,02	0,000221
407	gene31882 cdpk-related protein kinase-like	5,77	11,65	-5,88	-2,02	0,000096
408	gene32159 rna-dependent rna polymerase 2-like	6,94	14,03	-7,09	-2,02	0,000015
409	gene09196 pentatricopeptide repeat-containing protein chloroplastic-like	1,60	3,24	-1,63	-2,02	0,000177
410	gene17083 rossmann-fold nad -binding domain-containing protein	0,95	1,91	-0,97	-2,02	0,000052
411	gene25884 cytochrome p450 94a1-like	9,63	19,48	-9,85	-2,02	0,000129
412	gene16928 #iREF!	0,59	1,20	-0,61	-2,02	0,000607
413	gene13582 btb poz domain-containing protein at3g08570-like	3,98	8,10	-4,12	-2,03	0,000345
414	gene29663 protein scar3-like	6,17	12,57	-6,39	-2,04	0,000116
415	gene05811 spermine synthase	2,39	4,88	-2,48	-2,04	0,000463
416	gene24757 xylogen like protein 12	22,31	45,52	-23,20	-2,04	0,000000
417	gene14415 zinc finger ccch domain-containing protein 53-like	18,22	37,18	-18,96	-2,04	0,000021
418	gene22660 squamosa promoter-binding-like protein 9-like	4,66	9,52	-4,86	-2,04	0,000166
419	gene20982 zinc finger ccch domain-containing protein 29-like	507,63	1037,40	-529,76	-2,04	0,000600
420	gene27535 #iREF!	0,31	0,64	-0,33	-2,04	0,000563
421	gene27731 resistance to phytophthora 1 protein	0,87	1,78	-0,91	-2,05	0,000917
422	gene09404 laccase 1	5,50	11,25	-5,75	-2,05	0,000269
423	gene15123 hypothetical protein PRUPE_ppa001927mg	0,80	1,64	-0,84	-2,05	0,000045
424	gene31826 probable polygalacturonase-like	10,34	21,20	-10,87	-2,05	0,000033
425	gene01317 protein	5,97	12,27	-6,30	-2,06	0,000108
426	gene18445 aspartic proteinase nepenthesin-1-like	19,41	39,90	-20,49	-2,06	0,000041
427	gene11266 plastid transcriptionally active 6	1,59	3,27	-1,68	-2,06	0,000530
428	gene08324 histone-lysine n-methyltransferase suvr2	11,83	24,39	-12,56	-2,06	0,000024

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
429	gene30252 bzip transcription factor bzip39	19,63	40,48	-20,85	-2,06	0,000021
430	gene03732 50s ribosomal protein chloroplastic-like	8,49	17,53	-9,04	-2,07	0,000098
431	gene18605 caffeic acid 3-o-methyltransferase-like	4,37	9,04	-4,66	-2,07	0,000233
432	gene03763 agenet and bromo-adjacent homology domain-containing protein	58,30	120,46	-62,16	-2,07	0,000050
433	gene23868 probable inactive receptor kinase at5g67200-like	4,46	9,23	-4,77	-2,07	0,000123
434	gene26094 replication protein a 70 kda dna-binding subunit	2,90	6,00	-3,10	-2,07	0,000197
435	gene11284 probable rna-dependent rna polymerase 3-like	1,45	3,00	-1,55	-2,07	0,000356
436	gene02313 pentatricopeptide repeat-containing protein mitochondrial-like	6,03	12,47	-6,44	-2,07	0,000073
437	gene34006 nac domain containing protein 50	1,39	2,87	-1,48	-2,07	0,000031
438	Gene 531 #N/A	7,58	15,70	-8,12	-2,07	0,000069
439	gene30172 gras family transcription factor	9,74	20,19	-10,46	-2,07	0,000080
440	gene24889 cold-regulated 413 inner membrane protein chloroplastic-like	38,39	79,70	-41,30	-2,08	0,000485
441	gene03566 phosphoglycerate bisphosphoglycerate mutase family protein isoform 1	0,85	1,77	-0,92	-2,08	0,000880
442	gene19280 dehydration-responsive protein rd22	372,05	775,26	-403,21	-2,08	0,000445
443	gene28605 cyclin-dependent kinase inhibitor 7-like	2,60	5,42	-2,82	-2,08	0,000516
444	gene30370 transcription factor tcp2-like	23,56	49,18	-25,62	-2,09	0,000307
445	gene12497 membrane lipoprotein	13,18	27,52	-14,34	-2,09	0,000532
446	gene30773 protein srg1-like	13,24	27,66	-14,41	-2,09	0,000652
447	gene13675 hat dimerisation domain-containing	0,45	0,94	-0,49	-2,09	0,000081
448	gene04900 bzip domain class transcription factor	4,75	9,92	-5,18	-2,09	0,000297
449	gene01540 protein	7,13	14,92	-7,79	-2,09	0,000162
450	gene18098 probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g67720-like	2,20	4,60	-2,40	-2,09	0,000144
451	gene04495 protein nsp-interacting kinase 2-like	3,97	8,31	-4,34	-2,09	0,000972
452	gene08105 u-box domain-containing protein 3-like	2,90	6,08	-3,18	-2,09	0,000157
453	gene32452 #¡REF!	0,26	0,54	-0,28	-2,10	0,000119
454	gene20205 cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like	5,56	11,65	-6,09	-2,10	0,000924
455	gene01543 PREDICTED: uncharacterized protein ycf36-like	1,21	2,54	-1,33	-2,10	0,000151
456	gene13602 gag-pol polyprotein	0,94	1,98	-1,04	-2,10	0,000004
457	gene00196 squamosa promoter-binding protein 1-like	4,09	8,59	-4,50	-2,10	0,000042
458	gene23489 ribonuclease h protein at1g65750-like	1,14	2,41	-1,26	-2,10	0,000516
459	gene32544 zinc knuckle (cchc-type) family protein	1,36	2,86	-1,50	-2,11	0,000836
460	gene29769 glutaredoxin-c9-like	298,51	628,99	-330,48	-2,11	0,000459
461	gene05500 #¡REF!	0,90	1,91	-1,01	-2,11	0,000073
462	gene13547 probable wrky transcription factor 70-like	6,55	13,89	-7,34	-2,12	0,000572
463	gene02195 chloroplast rna binding protein precursor	0,93	1,98	-1,05	-2,12	0,000073
464	gene23345 intracellular protein transport protein isoform 1	1,64	3,47	-1,84	-2,12	0,000152
465	gene29819 protein chup1	8,95	19,00	-10,05	-2,12	0,000003
466	gene13094 probable protein phosphatase 2c 76-like	8,98	19,07	-10,09	-2,12	0,000009
467	gene00641 leucine-rich repeat-containing protein 50	5,97	12,69	-6,73	-2,13	0,000143
468	gene32503 aquaporin pip1-2	23,06	49,25	-26,19	-2,14	0,000484

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
469	gene02361 glycolate oxidase	4,16	8,90	-4,74	-2,14	0,000022
470	gene20645 linoleate 13s-lipoxygenase 2- chloroplastic-like	4,10	8,77	-4,67	-2,14	0,000541
471	gene30530 glucan endo- -beta-glucosidase 2-like	7,55	16,14	-8,60	-2,14	0,000794
472	gene01357 protein	23,11	49,47	-26,36	-2,14	0,000104
473	gene08757 transcription factor bzip	0,90	1,92	-1,02	-2,14	0,000304
474	gene21187 protein dyad-like	2,06	4,41	-2,35	-2,14	0,000255
475	gene21045 chromatin remodeling complex subunit isoform 1	7,07	15,16	-8,09	-2,14	0,000386
476	gene24989 cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like	3,40	7,29	-3,89	-2,15	0,000029
477	gene01453 rna polymerase ii elongation factor ell3 isoform 1	14,60	31,35	-16,75	-2,15	0,000523
478	gene23712 aquaporin pip	137,41	295,24	-157,83	-2,15	0,000613
479	gene01869 uncharacterized loc101209217	165,76	356,25	-190,49	-2,15	0,000096
480	gene12308 wrky transcription factor 11	91,40	196,53	-105,12	-2,15	0,000014
481	gene14810 zinc finger ccch domain-containing protein 53-like	19,61	42,18	-22,57	-2,15	0,000003
482	gene25942 homeobox-leucine zipper protein hat5-like isoform 1	41,68	89,72	-48,05	-2,15	0,000724
483	gene06788 gtp1 obg family protein	1,37	2,95	-1,58	-2,15	0,000163
484	gene10501 transcription factor myc2-like	428,44	924,78	-496,34	-2,16	0,000227
485	gene21538 at5g16250 t21h19_170	32,84	70,92	-38,08	-2,16	0,000414
486	gene12634 transmembrane 9 superfamily member 4-like	5,49	11,86	-6,37	-2,16	0,000015
487	gene08703 peroxidase 45-like	8,57	18,56	-9,98	-2,16	0,000248
488	gene27942 beta- -mannosyl-glycoprotein 4-beta-n-acetylglucosaminyltransferase-like	2,46	5,33	-2,87	-2,17	0,000221
489	gene28574 ethylene-responsive transcription factor erf109-like	40,15	87,00	-46,84	-2,17	0,000180
490	gene14131 protein	7,79	16,89	-9,10	-2,17	0,000043
491	gene06538 tmv resistance protein n-like	16,24	35,20	-18,96	-2,17	0,000031
492	gene14139 pathogenesis-related thaumatin-like protein	50,09	108,75	-58,65	-2,17	0,000169
493	gene01354 n-hydroxycinnamoyl benzoyltransferase	14,20	30,84	-16,64	-2,17	0,000842
494	gene32076 probable wrky transcription factor 53-like	357,18	775,87	-418,69	-2,17	0,000896
495	gene08411 transcription factor pif1-like	0,53	1,16	-0,63	-2,17	0,000460
496	gene03953 spindle and kinetochore-associated protein 1 homolog	2,51	5,46	-2,95	-2,17	0,000554
497	gene14577 uncharacterized loc101220098	2,43	5,29	-2,86	-2,18	0,000020
498	Gene 479 #N/A	37,66	81,96	-44,30	-2,18	0,000025
499	gene06295 squamosa promoter-binding-like protein 13a-like	7,44	16,24	-8,79	-2,18	0,000798
500	gene14852 alanine glyoxylate aminotransferase	8,88	19,39	-10,51	-2,18	0,000141
501	gene15491 #IREF!	14,99	32,74	-17,76	-2,18	0,000286
502	gene29968 protein rdm1-like	3,38	7,40	-4,02	-2,19	0,000622
503	gene22943 dead-box atp-dependent rna helicase chloroplastic-like	5,36	11,77	-6,41	-2,20	0,000006
504	gene19637 glucan endo- -beta-glucosidase 1-like	8,24	18,14	-9,90	-2,20	0,000176
505	gene11283 probable rna-dependent rna polymerase 5-like	1,01	2,21	-1,21	-2,20	0,000011
506	gene02631 probable xyloglucan glycosyltransferase 12-like	89,34	197,00	-107,65	-2,20	0,000069
507	gene00903 indeterminate -domain isoform 2	10,05	22,17	-12,12	-2,21	0,000900

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
508	gene12926 peroxiredoxin q	6,88	15,18	-8,30	-2,21	0,000387
509	gene09478 thiol-disulfide oxidoreductase dcc	0,44	0,96	-0,53	-2,21	0,000258
510	gene25273 transcription factor bhlh63-like	7,41	16,35	-8,94	-2,21	0,000110
511	gene27210 protein	17,84	39,43	-21,59	-2,21	0,000223
512	gene18074 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101293609	7,73	17,12	-9,40	-2,22	0,000046
513	gene01321 thaumatin-like protein 1-like	0,71	1,57	-0,86	-2,22	0,000427
514	gene20264 zinc finger protein nutcracker-like	4,12	9,15	-5,03	-2,22	0,000293
515	gene28704 transcription factor bhlh150-like	10,99	24,41	-13,42	-2,22	0,000480
516	gene19395 #jREF!	1,36	3,03	-1,67	-2,23	0,000108
517	gene19307 u-box domain-containing protein 33-like	5,99	13,39	-7,40	-2,23	0,000123
518	gene10292 thylakoid lumenal protein chloroplastic-like	5,18	11,58	-6,41	-2,24	0,000837
519	gene20467 probable glutamate carboxypeptidase 2-like	0,47	1,06	-0,59	-2,24	0,000488
520	gene30797 f-box lrr-repeat protein 14-like	6,39	14,31	-7,92	-2,24	0,000115
521	gene13232 at5g52420 k24m7_17	4,89	10,96	-6,08	-2,24	0,000010
522	gene08369 receptor-like serine threonine-protein kinase ale2-like	6,37	14,34	-7,97	-2,25	0,000075
523	gene12913 tmv resistance protein n-like	24,29	54,68	-30,39	-2,25	0,000054
524	gene11332 glucan endo- -beta-glucosidase 13-like	10,27	23,15	-12,88	-2,25	0,000076
525	gene03603 cysteine-rich receptor-like protein kinase 3-like	14,07	31,72	-17,65	-2,25	0,000037
526	gene27980 31 kda chloroplastic-like	4,85	10,96	-6,11	-2,26	0,000121
527	gene27564 30s ribosomal protein s1-like	0,63	1,43	-0,80	-2,26	0,000122
528	gene08475 auxin-induced protein 5ng4-like	28,86	65,30	-36,45	-2,26	0,000356
529	gene26281 isoform 2	1,56	3,53	-1,97	-2,26	0,000039
530	gene26389 uncharacterized loc101219072	12,41	28,18	-15,76	-2,27	0,000049
531	gene17437 probable glucan endo- -beta-glucosidase a6-like	9,72	22,07	-12,35	-2,27	0,000196
532	gene00193 transcription factor lhw-like	1,05	2,40	-1,34	-2,27	0,000224
533	gene25122 cellulose synthase-like protein g3-like	1,58	3,59	-2,01	-2,27	0,000224
534	gene19151 ---NA---	0,36	0,83	-0,46	-2,27	0,000431
535	gene00803 nicotinamidase 2	9,55	21,75	-12,19	-2,28	0,000357
536	gene03699 probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at1g68400-like	5,39	12,29	-6,90	-2,28	0,000505
537	gene13896 phototropin 1 isoform 1	6,33	14,43	-8,11	-2,28	0,000013
538	gene20400 nad h-quinone oxidoreductase subunit isoform 1	5,06	11,56	-6,51	-2,29	0,000118
539	gene16203 #jREF!	0,38	0,86	-0,48	-2,29	0,000909
540	gene34666 chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	13,05	29,89	-16,84	-2,29	0,000523
541	Gene 113 #N/A	20,14	46,14	-26,00	-2,29	0,000149
542	Gene 117 #N/A	81,35	187,23	-105,88	-2,30	0,000149
543	gene18104 transcription factor asg4-like	1,74	4,02	-2,28	-2,31	0,000795
544	gene24519 probable protein phosphatase 2c 49-like	100,54	232,26	-131,73	-2,31	0,000156
545	gene19613 low quality protein: uncharacterized loc101218032	44,82	103,69	-58,88	-2,31	0,000019
546	gene20074 hydroxyproline-rich glyco protein	13,18	30,50	-17,33	-2,32	0,000164
547	gene27171 transcription factor tcp4-like	8,90	20,63	-11,72	-2,32	0,000754

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
548	gene24119 probable disease resistance protein at5g66900-like	31,30	72,55	-41,26	-2,32	0,000262
549	gene08679 f-box only protein 13-like	2,43	5,65	-3,22	-2,32	0,000750
550	gene22666 rhodanese-like domain-containing protein chloroplastic-like	1,60	3,72	-2,12	-2,32	0,000286
551	gene22931 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101294277	5,95	13,84	-7,88	-2,32	0,000049
552	gene23194 kinase superfamily protein isoform 1	2,76	6,41	-3,65	-2,32	0,000140
553	gene17168 rop guanine nucleotide exchange factor 1-like	13,04	30,44	-17,40	-2,33	0,000007
554	gene26366 protein binding	85,31	199,14	-113,84	-2,33	0,000004
555	gene30354 probable receptor protein kinase tmk1-like	4,45	10,39	-5,94	-2,34	0,000091
556	gene00185 r2r3-myb transcription factor	133,52	312,56	-179,04	-2,34	0,000188
557	gene16305 at4g39900 t5j17_70	0,89	2,09	-1,20	-2,34	0,000077
558	gene17125 #iREF!	2,19	5,13	-2,94	-2,34	0,000032
559	gene29159 bzip transcription factor 60-like	106,35	249,29	-142,94	-2,34	0,000098
560	gene22513 sucrose nonfermenting 4-like	1,81	4,25	-2,44	-2,35	0,000326
561	gene20960 chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	1,27	2,99	-1,72	-2,36	0,000180
562	gene07992 50s ribosomal protein chloroplastic-like	4,27	10,06	-5,80	-2,36	0,000372
563	gene27472 leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase at2g41820-like	20,95	49,43	-28,48	-2,36	0,000718
564	gene00546 probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at1g66830-like	2,95	6,99	-4,03	-2,37	0,000527
565	gene14894 leucine-rich repeat family protein	7,88	18,64	-10,76	-2,37	0,000269
566	gene18861 chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	18,57	43,98	-25,41	-2,37	0,000228
567	gene18590 nac domain-containing protein 74-like	2,23	5,28	-3,05	-2,37	0,000007
568	gene26790 g-type lectin s-receptor-like serine threonine-protein kinase rlk1-like	15,78	37,50	-21,71	-2,38	0,000173
569	gene28874 probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at4g20940-like	5,57	13,23	-7,66	-2,38	0,000142
570	gene26957 30s ribosomal protein chloroplastic-like	5,70	13,57	-7,86	-2,38	0,000081
571	gene12518 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101290902	1,21	2,88	-1,67	-2,38	0,000387
572	gene01542 chaperone protein dnaj	1,00	2,38	-1,38	-2,39	0,000874
573	gene02335 p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	2,20	5,26	-3,06	-2,39	0,000131
574	gene17203 nac transcription partial	30,75	73,56	-42,81	-2,39	0,000066
575	gene30941 aux iaa protein isoform 1	0,69	1,64	-0,96	-2,39	0,000156
576	gene10570 proline synthase co-transcribed bacterial homolog	2,57	6,15	-3,59	-2,40	0,000285
577	gene10806 e3 ubiquitin-protein ligase ring1-like	1,23	2,95	-1,72	-2,40	0,000104
578	gene31335 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	21,00	50,45	-29,45	-2,40	0,000596
579	gene30036 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101307380	6,54	15,73	-9,20	-2,41	0,000118
580	gene03480 trigger factor-like protein tig-like	1,47	3,55	-2,08	-2,41	0,000017
581	gene11123 auxin transporter-like protein 3-like	7,47	18,02	-10,54	-2,41	0,000012
582	gene00437 low quality protein: uncharacterized loc101210164	8,09	19,50	-11,42	-2,41	0,000546
583	gene19436 gibberellin 20-oxidase	0,35	0,85	-0,50	-2,43	0,000254
584	gene06098 heavy metal-associated domain containing expressed	32,88	79,83	-46,94	-2,43	0,000034
585	gene23429 probable pectate lyase 12-like	5,97	14,48	-8,52	-2,43	0,000323
586	gene23802 heat stress transcription factor a-4a-like	9,45	22,93	-13,49	-2,43	0,000005

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
587	gene10807 ---NA---	15,17	36,86	-21,69	-2,43	0,000041
588	gene31066 cucumber peeling cupredoxin-like	0,72	1,74	-1,03	-2,43	0,000433
589	gene22676 cytochrome p450 71a25-like	32,71	79,87	-47,16	-2,44	0,000178
590	gene03796 trichome birefringence-like 19	0,92	2,24	-1,32	-2,45	0,000859
591	gene13401 cdgsh iron-sulfur domain-containing protein 2-like	4,85	11,89	-7,05	-2,45	0,000861
592	gene22514 sucrose nonfermenting 4-like	1,69	4,14	-2,45	-2,46	0,000282
593	gene08229 cytochrome p450 94a1-like	16,77	41,19	-24,42	-2,46	0,000899
594	gene21022 ankyrin repeat domain-containing protein	1,66	4,08	-2,42	-2,46	0,000124
595	gene01174 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101310099	4,19	10,31	-6,12	-2,46	0,000559
596	gene11029 ferredoxin- chloroplastic-like	54,39	133,90	-79,51	-2,46	0,000666
597	gene34004 nac domain-containing protein 69-like	1,86	4,58	-2,72	-2,46	0,000319
598	gene08828 aquaporin tip4-1-like	12,64	31,17	-18,53	-2,47	0,000824
599	gene20186 ---NA---	2,30	5,67	-3,37	-2,47	0,000140
600	gene09356 protein tify 6b	9,44	23,31	-13,87	-2,47	0,000008
601	gene01054 protein tify 8-like	4,50	11,12	-6,62	-2,47	0,000063
602	gene18579 3-isopropylmalate chloroplastic-like	0,53	1,33	-0,79	-2,48	0,000415
603	gene18115 uncharacterized loc101221538	4,58	11,38	-6,80	-2,49	0,000721
604	gene10845 ethylene-responsive transcription factor 5-like	26,14	65,03	-38,89	-2,49	0,000157
605	gene31492 probable s-acyltransferase at2g33640-like	0,79	1,98	-1,18	-2,49	0,000662
606	gene01274 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101304208	55,35	137,90	-82,55	-2,49	0,000621
607	gene19368 ---NA---	2,89	7,20	-4,31	-2,49	0,000901
608	gene17369 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase	383,56	963,15	-579,59	-2,51	0,000517
609	gene20138 ---NA---	1,56	3,92	-2,36	-2,52	0,000348
610	gene13803 probable wrky transcription factor 33-like	162,00	408,90	-246,90	-2,52	0,000216
611	gene16185 photosystem i reaction center subunit chloroplastic-like	5,81	14,75	-8,94	-2,54	0,000425
612	gene01883 protein iq-domain 14-like	1,85	4,69	-2,84	-2,54	0,000164
613	gene08303 protein breast cancer susceptibility 1 homolog	1,33	3,39	-2,06	-2,55	0,000993
614	gene24657 oxygen-evolving enhancer protein 3- chloroplastic-like	20,15	51,45	-31,30	-2,55	0,000948
615	gene11285 #iREF!	1,39	3,56	-2,17	-2,56	0,000049
616	gene23392 subtilisin-like serine endopeptidase family protein	3,89	9,97	-6,08	-2,56	0,000365
617	gene15243 ---NA---	14,13	36,30	-22,17	-2,57	0,000352
618	gene33412 rubredoxin-like protein	1,62	4,17	-2,55	-2,57	0,000314
619	gene08327 cysteine-rich repeat secretory protein 3-like	0,84	2,16	-1,32	-2,58	0,000141
620	gene12316 uncharacterized membrane protein at1g06890-like	1,38	3,58	-2,19	-2,59	0,000357
621	gene30680 #iREF!	0,68	1,78	-1,09	-2,60	0,000175
622	gene24031 zeaxanthin epoxidase	0,87	2,25	-1,38	-2,60	0,000008
623	gene05891 uncharacterized loc101216953	1,62	4,25	-2,62	-2,62	0,000648
624	gene25633 #iREF!	0,68	1,77	-1,09	-2,62	0,000977
625	gene00364 probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at3g03770-like	9,19	24,09	-14,90	-2,62	0,000037
626	gene18778 o-fucosyltransferase family protein	31,47	82,54	-51,07	-2,62	0,000059



Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
627	gene13376 alpha-l-fucosidase 1-like	2,84	7,45	-4,61	-2,62	0,000131
628	gene08473 cysteine proteinase rd19a-like	26,89	70,86	-43,97	-2,64	0,000370
629	gene14587 tmv resistance protein n-like	4,66	12,30	-7,63	-2,64	0,000263
630	gene27212 hypothetical protein PRUPE_ppa023086mg	0,31	0,81	-0,51	-2,64	0,000481
631	gene28781 oxygen-evolving enhancer protein 2	21,30	56,28	-34,98	-2,64	0,000816
632	gene13546 probable wrky transcription factor 70-like	1,86	4,93	-3,07	-2,65	0,000293
633	gene04567 dna binding protein	0,43	1,13	-0,71	-2,66	0,000951
634	gene09288 ---NA---	0,88	2,36	-1,47	-2,66	0,000591
635	gene03694 probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at1g68400-like	4,17	11,11	-6,94	-2,66	0,000186
636	gene08941 hypothetical protein PRUPE_ppa013404mg	3,48	9,29	-5,81	-2,67	0,000172
637	gene24743 #¿NOMBRE?	0,38	1,01	-0,63	-2,68	0,000436
638	gene16804 photosystem i reaction center subunit chloroplastic-like	26,91	72,10	-45,20	-2,68	0,000094
639	gene16760 chromatin remodeling complex subunit	5,21	14,00	-8,79	-2,69	0,000049
640	gene01554 btb poz domain-containing protein at5g67385-like	17,93	48,35	-30,42	-2,70	0,000107
641	gene13381 cytochrome p450 704c1-like	7,81	21,10	-13,29	-2,70	0,000001
642	gene18934 cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like	1,32	3,58	-2,26	-2,72	0,000353
643	gene27853 eid1-like f-box protein 3-like	1,35	3,68	-2,32	-2,72	0,000331
644	gene18109 reticuline oxidase-like	0,33	0,90	-0,57	-2,72	0,000394
645	gene03736 ribulose biphosphate small subunit	4,50	12,32	-7,81	-2,74	0,000321
646	gene26181 calcium sensing chloroplastic-like	1,67	4,58	-2,91	-2,74	0,000250
647	gene13216 #¡REF!	0,57	1,55	-0,99	-2,75	0,000067
648	gene19372 b3 domain-containing protein rem9-like isoform 1	1,44	3,97	-2,52	-2,75	0,000100
649	gene30214 protein tic chloroplastic-like	2,17	5,96	-3,80	-2,75	0,000351
650	gene30466 f-box lrr-repeat protein	24,89	68,65	-43,77	-2,76	0,000564
651	gene17454 lipid-transfer protein dir1-like	86,37	238,60	-152,24	-2,76	0,000039
652	gene15093 uncharacterized loc101220556	5,08	14,05	-8,97	-2,77	0,000013
653	gene18438 probable wrky transcription factor 49-like	1,91	5,28	-3,37	-2,77	0,000285
654	gene00938 psbp domain-containing protein chloroplastic-like	0,40	1,11	-0,71	-2,77	0,000728
655	gene16674 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101295143	8,24	22,99	-14,75	-2,79	0,000024
656	gene27107 probable disease resistance protein at5g66900-like	66,11	184,99	-118,88	-2,80	0,000290
657	gene31800 #¡REF!	0,95	2,66	-1,71	-2,80	0,000027
658	gene13782 mate efflux family protein chloroplastic-like	0,32	0,89	-0,57	-2,81	0,000176
659	gene20865 bel1-like homeodomain protein 9-like	0,81	2,29	-1,48	-2,81	0,000279
660	gene25943 nitrate transporter -like	0,39	1,12	-0,73	-2,85	0,000046
661	gene01229 probable disease resistance protein at5g66900-like	6,89	19,65	-12,77	-2,85	0,000023
662	gene24861 subtilisin-like protease-like	0,69	1,96	-1,28	-2,86	0,000115
663	gene17368 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase	152,57	437,11	-284,54	-2,86	0,000009
664	gene00573 PREDICTED: uncharacterized protein LOC101297951	0,59	1,75	-1,16	-2,98	0,000016
665	gene20310 protein	7,67	23,01	-15,34	-3,00	0,000113

Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value	
666	gene01553	btb poz domain-containing protein at5g67385-like	8,62	25,89	-17,27	-3,00	0,000773
667	gene13976	protein	2,35	7,06	-4,71	-3,01	0,000033
668	gene14692	photosystem ii 5 kda chloroplast	28,78	87,79	-59,01	-3,05	0,000357
669	gene00649	quinone oxidoreductase-like protein chloroplastic-like	0,56	1,74	-1,17	-3,08	0,000792
670	gene29606	pathogenesis-related protein pr-1-like	1,30	4,03	-2,73	-3,11	0,000022
671	gene30208	ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase	0,61	1,91	-1,30	-3,14	0,000031
672	gene00696	cyclin-d1-1-like	1,91	6,04	-4,13	-3,16	0,000004
673	gene00581	protein too many mouths-like	6,72	21,36	-14,63	-3,18	0,000104
674	gene06442	acyl carrier protein 4	2,10	6,79	-4,68	-3,22	0,000676
675	gene20644	linoleate 13s-lipoxygenase 2- chloroplastic-like	1,06	3,44	-2,39	-3,26	0,000258
676	gene26938	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101310219	1,02	3,31	-2,30	-3,26	0,000081
677	gene10852	---NA---	0,74	2,41	-1,68	-3,28	0,000732
678	gene02502	magnesium chelatase h subunit	2,87	9,52	-6,65	-3,32	0,000675
679	gene21365	probable wrky transcription factor 70-like	36,53	121,31	-84,78	-3,32	0,000435
680	gene00634	probable inactive poly	0,56	1,85	-1,30	-3,33	0,000583
681	gene22024	probable wrky transcription factor 51-like	3,10	10,45	-7,35	-3,37	0,000349
682	gene30923	probable protein abil5-like	3,54	11,94	-8,40	-3,37	0,000061
683	gene00834	btb poz domain-containing protein at3g19850-like	0,77	2,62	-1,85	-3,40	0,000005
684	gene21600	chlorophyll a b binding	7,16	24,38	-17,22	-3,40	0,000463
685	gene32210	uncharacterized loc101203522	4,90	16,83	-11,93	-3,43	0,000031
686	gene16406	protein frigida-like	0,65	2,27	-1,61	-3,47	0,000053
687	gene30897	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101309774	0,15	0,53	-0,38	-3,56	0,000843
688	gene15521	snf1-related protein kinase regulatory subunit beta-2-like	0,19	0,69	-0,50	-3,58	0,000903
689	gene03880	protein	5,31	19,16	-13,85	-3,61	0,000015
690	gene01770	swi snf-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A	0,39	1,43	-1,03	-3,64	0,000144
691	gene31278	protochlorophyllide chloroplastic-like	21,99	80,30	-58,31	-3,65	0,000151
692	gene24271	psi type iii chlorophyll a b-binding protein	13,48	49,55	-36,08	-3,68	0,000399
693	gene27813	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kda chloroplastic-like	0,67	2,46	-1,79	-3,68	0,000525
694	gene29996	probable serine threonine-protein kinase at1g18390-like	16,59	62,06	-45,47	-3,74	0,000019
695	gene12049	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101303619	6,08	22,77	-16,68	-3,74	0,000153
696	gene10956	nad h-quinone oxidoreductase subunit chloroplastic-like	0,83	3,14	-2,32	-3,80	0,000513
697	gene29607	pathogenesis-related protein pr-1-like	0,42	1,63	-1,21	-3,87	0,000876
698	gene14283	---NA---	0,18	0,71	-0,53	-4,00	0,000060
699	gene01653	probable fructose-bisphosphate aldolase chloroplastic-like	5,81	23,41	-17,60	-4,03	0,000658
700	gene18866	vacuolar cation proton exchanger 1-like	3,48	14,16	-10,68	-4,07	0,000101
701	gene23193	chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like	6,18	25,41	-19,22	-4,11	0,000316
702	gene26203	pinus taeda anonymous locus 2_3802_02 genomic sequence	1,04	4,31	-3,27	-4,15	0,000074
703	gene17376	ninja-family protein afp3	2,55	10,59	-8,04	-4,16	0,000686
704	gene13380	cytochrome p450 704c1-like	1,65	7,00	-5,36	-4,25	0,000184
705	gene31371	chlorophyll a-b binding expressed	10,81	46,12	-35,31	-4,27	0,000270

	Gen FV	Descripción de la secuencia	RR	NR	Diferencia	Fold Change	p-value
706	gene02111	hypothetical protein PRUPE_ppa020729mg	1,17	5,04	-3,88	-4,32	0,000108
707	gene28726	---NA---	0,22	1,00	-0,78	-4,59	0,000847
708	gene25944	protein	0,84	3,91	-3,07	-4,63	0,000080
709	gene07999	probable anion transporter chloroplastic-like	0,13	0,63	-0,49	-4,76	0,000816
710	gene00955	ring-h2 finger protein	0,22	1,29	-1,07	-5,77	0,000875