



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Tesis doctoral

Caracterización estructural y funcional de la proteína Fra a 1.02 en fruto de fresa



Begoña Orozco Navarrete

Directores: Victoriano Valpuesta Fernández y Catharina Merchante Berg


Programa de doctorado en Biotecnología Avanzada.
Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga, 2020.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Begoña Orozco Navarrete

 <https://orcid.org/0000-0001-8918-4683>

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

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Dr. VICTORIANO VALPUESTA FERNÁNDEZ, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Málaga, y Dra. MARÍA CATHARINA MERCHANTE BERG, Investigadora Ramón y Cajal en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga

INFORMAN:

Que Dña. BEGOÑA OROZCO NAVARRETE ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “Caracterización estructural y funcional de la proteína Fra a 1.02 en fruto de fresa” con la cual aspira a la obtención del grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, y tenga los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, se extiende el presente informe en Málaga, a 17 de Diciembre de 2019.



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

D./Dña BEGOÑA OROZCO NAVARRETE

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA FRA A 1.02 EN FRUTO DE FRESA.

Realizada bajo la tutorización de VICTORIANO VALPUESTA FERNÁNDEZ y dirección de MARÍA CATHARINA MERCHANT BERG (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

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

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

En Málaga, a 17 de DICIEMBRE de 2019

Fdo.: BEGOÑA OROZCO NAVARRETE



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga y en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” CSIC. Ha sido financiada con la beca de Formación del Personal Investigador (FPI) BES-2014-068723 del Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del proyecto “Genes reguladores de la maduración del fruto de fresa: estudio y evaluación del potencial biotecnológico” (BIO2013-44199R) concedido al Dr. Victoriano Valpuesta y por el proyecto Ramón y Cajal RYC-2017-22323 concedido a la Dra. Catharina Merchante.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a las personas que me han acompañado durante estos años de tesis, aunque el sentimentalismo no es lo mío como ya sabéis, así que probablemente no pueda reflejar como debiera a todos mi agradecimiento.

Para empezar me gustaría agradecer a mis directores todo el apoyo y la ayuda que me han dado durante estos años.

Victoriano, gracias por haberme dado la oportunidad de hacer la tesis hace ya tanto tiempo, siempre has estado muy atento a mi progreso y en ningún momento me he sentido desatendida, te has emocionado por los resultados incluso más que yo. Muchas gracias.

Karen, nunca imaginé que además de una co-directora iba a encontrarme con una amiga. Hemos pasado buenos momentos dentro y fuera de la universidad, por esos beer meetings, congresos, y sobre todo el viaje a Grenoble (te estaré eternamente agradecida por la visita)... Me has ayudado mucho con tu experiencia durante toda la tesis.

A Carmen Beuzón y Javi Ruíz, por darme la oportunidad de empezar en la ciencia como alumna interna.

A Araceli, muchísimas gracias por toda la ayuda con el doble híbrido, que no fue precisamente poca. Aunque hubiera algún ``yo te mato'', sé que fueron desde el cariño.

A Miguel Ángel, David, Eduardo, Sonia, Iri, por todas vuestras aportaciones en los lab meetings.

A mis compañeros de carrera, máster y tesis, son ya muchos años viéndonos todos los días y se os va a echar de menos. A Alba, por los momentos buenos vividos, por tu personalidad tan animada. A Blanca, por las largas charlas y por escuchar siempre, hasta la más mínima tontería. A Delphine, por estar siempre dispuesta a

ayudarme y por ser mi agenda personal, qué voy a hacer sin ti. A Álvaro García, por nuestras conversaciones y lo que nos entendemos. A Álvaro Piedra, por toda la ayuda durante estas tres etapas.

A mis compañeras de laboratorio, Delphine, Lidia, Carmen, Ali, Sara, Noemí, Selene, Vicky. A Carmen, con lo mal que empezamos y lo bien que hemos terminado, muchas gracias por toda tu ayuda y las charlas en los beer meetings. A Lidia y Sara, mis vecinas de poyata, por las charlas, risas y las invasiones mutuas de espacio. A Ali, por compartir tu conocimiento tan amablemente y las largas conversaciones.

A Amalia, gracias por toda la ayuda con los experimentos durante el tiempo que estuviste.

Al mis compañeros de la torre, tanto bioquímicos como genéticos, gracias por todos los ratos compartidos, las quedadas fuera del laboratorio, los congresos, y los ratitos en las comidas. Hemos pasado muy buenos ratos juntos. El clima de trabajo y el compañerismo que he vivido ha sido maravilloso. A Pepe, Miguel, Ana, Tábata, Alex, Laura, Manolo, Delphine, Carmen, Lidia, Sara, Noemí, Ali, Jessi, Selene, Vicky, Amalia, Eli, Álvaro García, Mario, Jose, Vitor, Fran Benítez, Fran Percio, Caro, Blanca, Bea, Álvaro Piedra, Vito, Almu, Carlos, María.

A los que más me ayudaron al principio, Vitor, Jessi y Eli, siempre dispuestos a dedicar un momento para ayudar.

A Lucía y Javi por cuidarme tan bien a mis niñas vegetales.

A los genéticos del departamento, me costó separarme de vosotros y me habéis hecho sentir siempre una más. Gracias por toda la ayuda y las casas rurales. A Jose, Ainhoa, Adela e Inma, que me ayudaron en los comienzos. A Alba, Diego, Eloy, Nieves, Adri, Luis, Carla, Javi, Isa Pérez, Isa Aragón, Pilar, Ángel y Pablo.

A mi familia y a Kike, por haberme apoyado en esta etapa.

Índice

Capítulo 1: Introducción	3
Familia Rosaceae, género <i>Fragaria</i>	3
<i>Fragaria x ananassa</i>	6
Control hormonal de la maduración del fruto de fresa	8
Propiedades y principales metabolitos del fruto de fresa	12
Familia de proteínas Fra a 1	13
Capítulo 2: Objetivos	24
Capítulo 3: Búsqueda de la proteína	25
interactora de Fra a 1	25
Búsqueda de la proteína interactora de Fra a 1 mediante doble híbrido en levaduras ..	25
Comprobación de autoactivación y toxicidad de Fra a 1 en levaduras	27
Las genotecas de cDNA de fresa en <i>pDEST22</i> están contaminadas con clones que autoactivan el sistema	30
Repetición de la búsqueda de interactores mediante doble híbrido de levaduras utilizando el sistema de Clontech	38
Caracterización del clon PP12.1 (<i>FaHSF3</i>)	42
Búsqueda de la proteína interactora mediante co-inmunoprecipitación no dirigida	51
Discusión	56
Capítulo 4: Cambios producidos por el silenciamiento de Fra a 1.02 en frutos	61
Caracterización de las plantas transgénicas	61
Análisis de metabolitos seleccionados en los frutos de las líneas transgénicas	68
Diferencias de expresión por RNA-seq en los frutos de las líneas de silenciamiento con respecto a los controles	75
Discusión	86
Capítulo 5: Structural Bases for the Allergenicity of Fra a 1.02 in Strawberry Fruits	94
Capítulo 6: Conclusiones	96
Capítulo 7: Materiales y métodos	97
Material vegetal	97
Construcciones	97

Amplificación de las genotecas de fresa y extracción de DNA para los ensayos de doble híbrido	100
Transformaciones en levaduras.....	100
Ensayos de doble híbrido	101
Extracción de proteínas y detección por <i>western blot</i>	102
Extracción DNA en levaduras.....	103
Agroinfiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	104
Co-inmunoprecipitación.....	105
Co-inmunoprecipitación no dirigida	106
Observación de muestras en microscopio confocal	107
Transformación de las plantas.....	107
Extracción de DNA genómico y comprobación de las líneas transgénicas	108
Extracción de RNA	109
Preparación de las muestras para RNA-seq	110
Análisis de los datos de RNA-seq.....	111
Análisis de metabolitos	111
Summary.....	115
Chapter 1: Introduction.....	115
Chapter 2: Aims.....	119
Chapter 3: Interactor protein search for Fra a 1	120
Chapter 4: Changes produced by the silencing of <i>Fra a 1.02</i> in fruits	125
Chapter 5: Structural basis for the allergenicity of Fra a 1.02 in strawberry fruits	131
Chapter 7: Conclusions.....	134
Referencias	135
Material suplementario	159

Capítulo 1: Introducción

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es un fruto altamente apreciado por su sabor, aroma y beneficios para la salud humana, y por ello tiene un alto valor comercial. En 2017, según datos de la FAO (Organización de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas), se produjeron 9,2 millones de toneladas de fresas en el mundo, de las cuales, el 49,9% se produjo en Asia, el 25,2% en América, el 17,9% en Europa, el 6,4% en África y el 0,5% restante en Oceanía (FAOSTAT, www.fao.org/faostat). En ese año, España fue el sexto país en el mundo y el primero en Europa en producción de fresas, con 360.416 Tm. La mayor parte del cultivo de fresa en España se produce en la provincia de Huelva, donde el número de programas de mejora va aumentando con los años y esto hace que cada vez haya más variedades que proporcionan un calendario más amplio de producción del fruto. Los programas de mejora más relevantes que en la temporada 2016/2017 suministraron variedades para el cultivo de la fresa en Huelva fueron los llevados a cabo por Fresas Nuevos Materiales (FNM), Universidad de Florida (EMCOCAL), Plant sciences/Berry genetics (viveros El Pinar), Universidad de California (Eurosemillas) y Planasa (Medina-Mínguez, *et. al.*, 2017). El desarrollo de programas de mejora se da gracias al avance en el conocimiento de los procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante el desarrollo y maduración del fruto.

Familia Rosaceae, género *Fragaria*

La fresa pertenece a la familia Rosaceae, que incluye frutales como el melocotonero, el albaricoque, el cerezo, el almendro, el manzano, la morera, el ciruelo, o el peral, entre otros, y especies ornamentales como la rosa. Dentro de la familia Rosaceae, la fresa pertenece al género *Fragaria*, que se caracteriza por su alto nivel de hibridación interespecífica y su poliploidía, lo que determina que dentro de este género haya especies con diferentes niveles de ploidía, que varían desde diploide hasta decaploide. Esta diversidad biológica, unida a la disponibilidad de recursos genómicos y la facilidad de crecimiento y experimentación, hace que *Fragaria* sea un sistema modelo dentro de la genómica ecológica y evolutiva (Liston *et al.*, 2014). Todas las especies de este género también comparten las características de ser plantas herbáceas perennes de crecimiento lento, presentar una propagación clonal, ser polinizadas por

insectos, tener frutos carnosos y de que sus semillas sean diseminados por animales (Johnson *et al.*, 2014).

La planta de la fresa está formada por una corona central desde donde salen los peciolos de las hojas en disposición espiral. Las hojas son trifoliadas, con un peciolo largo cuya longitud depende del termo-fotoperiodo. Los meristemos axilares pueden diferenciarse tanto en estolones como en coronas. El peciolo que contiene la inflorescencia se desarrolla a partir del vértice de la corona. Las inflorescencias están formadas por un pedúnculo principal que termina en una flor primaria, del que pueden salir dos pedúnculos secundarios que generan flores secundarias, de los que a su vez pueden emerger otros pedúnculos que terminarán en flores terciarias, e incluso de estos pueden surgir otros que derivarán en flores cuaternarias (Figura 1) (Savini *et al.*, 2005). Las flores son blancas, presentan simetría radial y presentan alrededor de 5 pétalos, aunque existe variación entre especies.

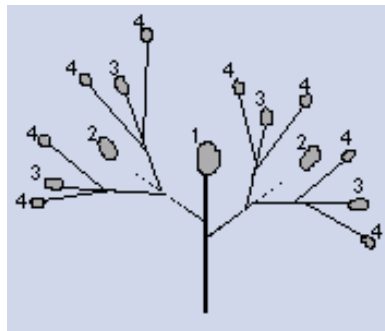


Figura 1.- Esquema de las inflorescencias en la planta de fresa. 1= Flor primaria, 2= Flor secundaria, 3= Flor terciaria, 4= Flor cuaternaria. Modificado de Savini *et al.*, 2005.

El inicio y finalización de la floración dependen de la variedad, de las condiciones ambientales de cultivo y del tamaño de la planta. También la división de la corona depende del tamaño de la planta, lo que está relacionado con las condiciones de crecimiento (Savini *et al.*, 2005).

Lo que se conoce popularmente como fruto de fresa es en realidad un falso fruto. Los verdaderos frutos son los aquenios, que se encuentran en la superficie del receptáculo, el cual proviene de un engrosamiento del receptáculo floral. Los aquenios se encuentran en la epidermis del receptáculo, al que se conectan mediante haces vasculares. Esto es una característica común para todo el género *Fragaria*. Sin embargo,

existe cierta diversidad entre los receptáculos de las diferentes especies, también incluso dentro de una misma especie (Liston *et al.*, 2014). El receptáculo está compuesto por la médula interna, el córtex, los haces vasculares y la epidermis (Figura 2) (Jewell *et al.*, 1973). Los aquenios suponen un 1 % del peso del fruto, aunque aportan el 11 % y el 14 % de los compuestos fenólicos y actividades antioxidantes respectivamente (Aaby *et al.*, 2005).

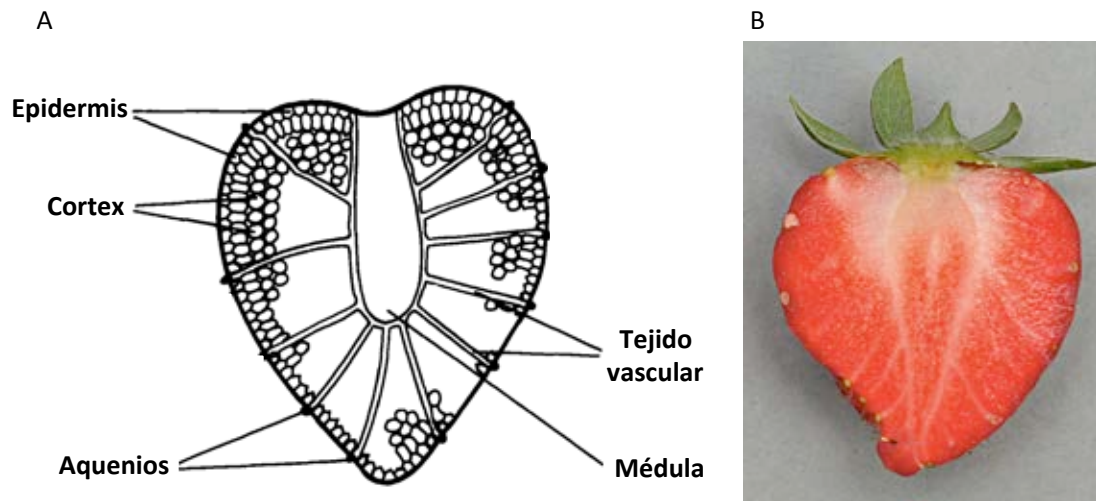


Figura 2.- Corte longitudinal de un fruto de fresa. A) Esquema del corte del fruto adaptado de Jewell *et al.*, 1973. **B)** Corte longitudinal de un fruto de fresa.

El género *Fragaria* alberga todos los posibles sistemas sexuales desde el hermafroditismo al dioico (Liston *et al.*, 2014). También presenta gran variación en el nivel de ploidía. Las especies poliploides son más grandes y vigorosas, presentando las octoploides un mayor rendimiento en la producción de frutos y siendo éstos más grandes (Sherman, 1966). Esta variabilidad en la ploidía y la diversidad del sistema sexual del género *Fragaria* han sido objeto de estudio a lo largo de la historia, y gracias a ellos se han podido responder cuestiones relacionadas con las transiciones evolutivas fundamentales y universales en las plantas con flor.

Filogenéticamente el género *Fragaria* se divide en tres subclados, el clado europeo, el de Asia oriental y el clado FII-FAN (*F. iinumae*-FANhybrid) (Qiao *et al.*, 2016). Las especies del este de Asia aparecen en todos los clados, lo que sugiere que es allí donde se originó el género *Fragaria*, hace unos 8 millones de años. Actualmente este género está ampliamente extendido, distribuido en un amplio rango de Eurasia, Norte y Sur de América, y este de Asia (Johnson *et al.*, 2014). Esto hace que se

encuentre presente en hábitats con una gran diferencia de temperatura y altitud lo que conlleva una gran variabilidad genética en cuanto a la tolerancia a diferentes factores climáticos, así como a la resistencia a patógenos (Hancock & Luby, 1993). Su capacidad de propagación clonal le proporciona también una ventaja de supervivencia en determinadas situaciones (Liston *et al.*, 2014).

Los genomas de algunas especies de fresa, como la diploide silvestre *Fragaria vesca* y la octoploide cultivada *Fragaria x ananassa*, están secuenciados, con diferentes niveles de profundidad, y se encuentran depositados en la base de datos del genoma de la familia Rosaceae, *Genome Database for Rosaceae* (GDR; www.rosaceae.org). GDR contiene datos de ensamblaje y anotaciones del genoma de seis especies del género *Fragaria* y de 14 especies más de la familia Rosaceae (Jung *et al.*, 2018). Desde la primera publicación del genoma de *Fragaria vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) se ha avanzado mucho en la profundidad, precisión y anotación de los diferentes genomas de *Fragaria*. Ello ha permitido el desarrollo de estudios de genómica y transcriptómica en los frutos de diferentes especies del género que han ayudado a conocer mejor el proceso de desarrollo y maduración (Kang *et al.*, 2013; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). La información genómica y el avance en los análisis transcriptómicos ha permitido también estudiar los mecanismos de formación de poliploides y su control transcriptómico, aunque la alta similitud de secuencias entre los diferentes genomas dificulta este tipo de estudios, ya que es difícil identificar los diferentes subgenomas dentro de un poliploide.

Fragaria x ananassa

El presente trabajo se ha realizado en *Fragaria x ananassa*, que es la especie de fresa que se comercializa mayoritariamente. Se trata de un organismo octoploide que proviene de cruzamiento espontáneo, que se produjo hace unos 300 años, entre dos especies octoploides, *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*. Estas especies parentales a su vez provienen de progenitores diploides cuyo material genético se fusionó en un solo núcleo hace un millón de años (Edger *et al.*, 2019). Se ha postulado que los cuatro progenitores son *F. iinumae*, *F. niponica* (ambas endémicas de Japón), *F. viridis* (distribuida en Europa y Asia) y *F. vesca* subsp. *bracheata* (endémica del oeste de América del Norte). Se piensa que un antecesor hexaploide cruzó desde Asia a América del Norte e hibridó con *F. vesca* subsp. *bracheata* hace 1,1 millones de años

(Edger *et al.*, 2019). Pero esto ha sido contradicho recientemente por Liston *et al.*, 2019, defendiendo que no hay evidencias de que ni *F. nipponica* ni *F. viridis* sean ancestros de las *Fragaria* octoploides. Por el contrario, postulan que uno de los subgenomas proviene de *F. vesca* subsp. *bracheata*, otro de *F. iinumae* (ambos coincidiendo con Edger *et al.*, 2019) y los otros dos podrían venir de un antecesor autotetraploide cuyo progenitor diploide más cercano es *F. iinumae*. El subgenoma de *F. vesca*, que es el dominante en la fresa octoploide debido a que tiene más genes ancestrales presentes y un mayor número de genes duplicados en tándem en la fresa actual en comparación con los otros tres subgenomas, también reemplazó grandes porciones de los otros subgenomas por intercambios homeólogos (Edger *et al.*, 2019). La fresa cultivada combina el aroma dulzón de *F. virginiana* y el gran tamaño de *F. chiloensis* (Vergauwen & De Smet, 2019). Es un organismo hermafrodita que es capaz de autofecundarse, aunque sus progenitores no lo son, ya que *F. chiloensis* es una especie dioica (con organismos machos y hembras) y *F. virginiana* es subdioica (con organismos hermafroditas, machos y hembras) (Liston *et al.*, 2014).

El genoma de esta especie de fresa está secuenciado y su última versión, recientemente publicada (Edger *et al.*, 2019), está disponible en la base de datos de GDR, siendo un ensamblaje a nivel cromosomal más completo que el que se encontraba previamente en dicha base de datos (Hirakawa *et al.*, 2014).

La domesticación de la fresa cultivada ha influido en su evolución, al igual que muchas otras especies cultivadas. Mediante genómica evolutiva se han identificado los genes seleccionados positivamente que están relacionados con caracteres agronómicos en la fresa cultivada, siendo la producción, la calidad y el sabor del fruto los caracteres que mayor selección han tenido (Qiao *et al.*, 2016). Entre estos se encuentran los genes relacionados con el contenido en carbohidratos, compuestos básicos para el crecimiento y desarrollo del fruto, así como precursores de algunos metabolitos relacionados con la calidad del fruto. También los genes relacionados con la biosíntesis de hormonas y la transmisión de señales, que pueden afectar al crecimiento y maduración del fruto (Qiao *et al.*, 2016).

Durante la maduración, el fruto de *F. x ananassa* pasa por unos estadios en los que va cambiando su color, tamaño y composición. Aunque el desarrollo es continuo,

para el estudio se suelen considerar como etapas importantes varios estadios que hacen referencia al color del fruto, y que responden a diferentes estados fisiológicos. Así, se considera el verde como primer estadio, y posteriormente pasa a los estadios blanco, intermedio y rojo (Figura 3). Durante maduración del fruto se produce un aumento en el contenido de los sólidos solubles del receptáculo, en la síntesis de los compuestos responsables del aroma y sabor, y aumento en el tamaño del receptáculo y cambios en la forma, textura y pigmentación (Aharoni & O'Connell, 2002).

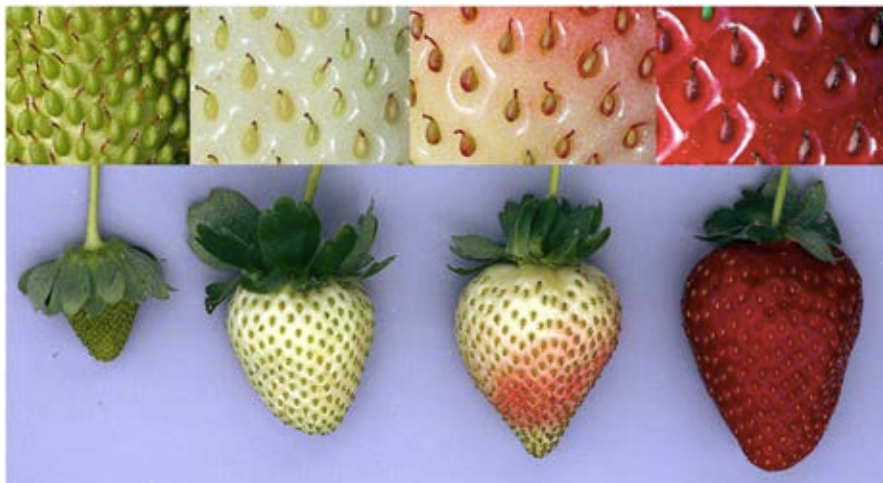


Figura 3.- Estadios de maduración del fruto de *F. x ananassa*. De izquierda a derecha los estadios son verde, blanco, intermedio y rojo. Imagen modificada de Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017.

Control hormonal de la maduración del fruto de fresa

La fresa es un fruto no climatérico, pues el inicio de su maduración no está determinado por un aumento de la respiración y un pico de producción de etileno. Su maduración está principalmente determinada por otras hormonas, siendo el balance auxina/ácido abscísico (ABA) el más importante desde el punto de vista global del desarrollo del proceso, lo que no excluye que otras hormonas intervengan en algún momento del desarrollo (Perkins-Veazie, 1995; Jia *et al.*, 2011). En los primeros estadios, la auxina regula la expresión de genes implicados en el proceso de desarrollo y crecimiento del fruto. Está presente en altos niveles en aquenios, donde es sintetizada (Gu *et al.*, 2019). Su transporte al receptáculo provoca la expansión de las células del mismo en etapas tempranas del desarrollo, determinando así el tamaño final del fruto, y a su vez impide la maduración temprana de este (Perkins-Veazie, 1995; Jia *et al.*, 2011). Clásicamente se ha considerado que el nivel de auxinas presenta su máximo en fruto

verde y que a partir de ahí disminuye, y es esta bajada la que permite la maduración del receptáculo. Sin embargo, dos trabajos recientes matizan esta teoría. Por un lado, el análisis transcriptómico de frutos de la fresa cultivada, *F. x ananassa*, a lo largo de la maduración ha mostrado una activa síntesis y señalización de auxina en el receptáculo maduro (Estrada-Johnson *et al.*, 2017). Por otro lado, en la especie diploide *F. vesca* (Figura 4) se ha comprobado que el nivel de auxina permanece constante a lo largo de la maduración del fruto (más alto en aquenios que en receptáculos, pero constante en cada tejido), y que durante la maduración disminuye la expresión de algunos de los genes *ARF*, mientras que otros mostraban una expresión constante, como *FvARF6a*, que además presenta una mayor expresión en los frutos que en los aquenios (Gu *et al.*, 2019). El ortólogo de este gen en *F. x ananassa*, *FaARF6a*, también mostraba máxima expresión en el receptáculo maduro (Estrada-Johnson *et al.*, 2017). En ambas especies se ha detectado un aumento de la expresión tanto del receptor *TIR1*, como de los genes implicados en la síntesis, *FaTAR2* y *FvTAA1*, con la maduración del fruto (Estrada-Johnson *et al.*, 2017; Gu *et al.*, 2019). Todo lo anterior apunta a la intervención de esta hormona en alguno de los procesos asociados a la maduración del fruto, probablemente delimitado espacio-temporalmente.

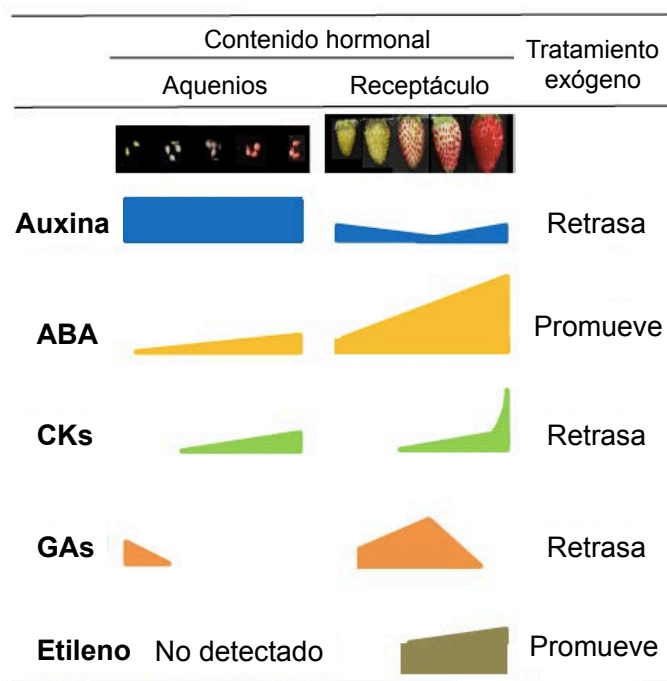


Figura 4.- Esquema del contenido de las principales hormonas que controlan la maduración en *F. vesca*. Adaptado de Gu *et al.*, 2019.

Cuando el fruto en desarrollo alcanza su tamaño final se incrementa el contenido de ABA debido al aumento de expresión de sus enzimas de síntesis y disminución de las de degradación (Figura 4). Su síntesis y acumulación se producen mayoritariamente en el receptáculo (Gu *et al.*, 2019). La presencia de ABA regula la expresión de un elevado número de genes implicados en la maduración, como los relacionados con la producción de antocianinas y los cambios en la pared celular (Jia *et al.*, 2011). También se ha propuesto que el ABA regule, directa o indirectamente, la expresión de los transportadores encargados de redistribuir la auxina del núcleo hasta el citosol, posiblemente disminuyendo la acción de esta hormona en el núcleo (Gu *et al.*, 2019).

Otra de las hormonas que participa en el proceso de desarrollo y maduración de la fresa es el etileno, a pesar de tratarse de un fruto no climatérico. Se ha mostrado que plantas de fresa insensibles a esta hormona por expresar el receptor mutado de etileno *etr1.1*, tienen alteradas la expresión de algunos genes relacionados con la síntesis de flavonoides y de la pared, así como alteraciones metabólicas importantes, aunque los frutos maduros no muestran un cambio fenotípico aparente significativo (Merchante *et al.*, 2013). En la maduración del fruto de *F. vesca* su precursor, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), presenta niveles elevados en el receptáculo comenzando a acumularse en el estadio intermedio temprano (Figura 4, Gu *et al.*, 2019). En *F. x ananassa*, el estudio del transcriptoma del fruto ha mostrado una expresión elevada y creciente de algunos genes anotados como *Ethylene Response Factors (ERFs)* (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017) con el proceso de maduración, lo que indica su intervención en alguno de los procesos que ocurren durante la maduración del receptáculo.

También en relación a las giberelinas se ha mostrado que tanto su síntesis como su señalización varían de forma significativa en el fruto de fresa a lo largo de su maduración, especialmente en la transición entre el crecimiento y la maduración (Csukasi *et al.*, 2011; Vallarino *et al.*, 2015). En *F. vesca*, Gu *et al.*, (2019) sugieren que el ácido giberélico tiene una función en los estadios tempranos de maduración, mientras que en estadios tardíos tiene un efecto negativo (Figura 4).

Ácido jasmónico (JA) es otra hormona que ha sido involucrada en la maduración de frutos carnosos como el tomate, induciendo la producción de licopeno (Liu *et al.*,

2012). En fresa, el tratamiento exógeno con metil jasmonato (MeJA) promovió en frutos *in vitro* el desarrollo de algunos procesos asociados a la maduración tal como la síntesis de antocianinas (Pérez *et al.*, 1997). Más recientemente, la expresión de una JA carboxil metiltransferasa endógena se ha correlacionado negativamente con la maduración del fruto de fresa (Preuss *et al.*, 2014). En frutos de fresa la concentración de Me-JA es muy baja y disminuye durante la maduración del fruto (Ganser *et al.*, 1997), por lo que se cree que participa en los primeros estadios de desarrollo del fruto.

Más recientemente, se ha mostrado que otros compuestos importantes en la maduración del fruto son las poliaminas, en concreto la espermina (Spm) (Guo *et al.*, 2018) y que esta regulación de la maduración del fruto mediada por poliaminas está relacionada con los niveles de ABA, etileno y auxina. Al principio del desarrollo del fruto la poliamina putrescina (Put) inhibe la maduración y promueve el crecimiento del fruto. Posteriormente, altos niveles de la enzima SAM-d Descarboxilasa hacen que la Put pase a espermidina (Spd) y después a espermina (Spm). La acumulación de ésta activa tanto la acumulación y señalización de ABA como la señalización de auxina. También actúa inhibiendo tanto la producción y señalización de etileno, así como la acumulación de auxina. Estos cambios tienen como consecuencia un aumento de la expresión de genes que promueven la maduración, relacionados con la pérdida de firmeza, el contenido de azúcares y el de antocianina (Guo *et al.*, 2018).

También se ha propuesto que las citoquininas tienen un papel en la maduración del fruto debido al gran aumento de la expresión de los genes de biosíntesis que se produce en estadio rojo (Gu *et al.*, 2019), aunque no se conoce si tiene papel como activador o represor de la maduración del fruto.

En relación a las interacciones entre hormonas hay estudios recientes en *F. vesca*, que han mostrado que la expresión del gen *CYP707A4a*, que participa en el catabolismo del ABA, es capaz de regular su acumulación, coordinar el tamaño del fruto, y además regular la señalización de auxina y ácido giberélico (Liao *et al.*, 2018). La expresión de este gen, potenciada por los altos niveles de auxina y ácido giberélico, inhibe la acumulación de ABA en el estadio de maduración temprana. Cuando auxina y ácido giberélico disminuyen a lo largo de la maduración del fruto, la expresión de *CYP707A4a* también lo hace, y se empieza a acumular ABA al final de la maduración.

Propiedades y principales metabolitos del fruto de fresa

El consumo de fresas conlleva beneficios para la salud humana, gracias a que son ricas en vitaminas, minerales, antocianinas y ácidos fenólicos. Los compuestos fenólicos presentes en la fresa pueden bloquear la producción de radicales libres, modular la expresión de genes implicados en el metabolismo y proliferación celular así como reparar el daño en el ADN, y son capaces de inhibir ciertas enzimas, evitando enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Giampieri *et al.*, 2015). El fruto de fresa contiene vitaminas liposolubles como β -caroteno, vitamina A, E y K, así como hidrosolubles tales como la vitamina C, la tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B6. También es rica en folato, un compuesto importante relacionado con la promoción de la salud, ya que interviene en la formación del sistema nervioso, entre otras funciones, y en la prevención de enfermedades como la hipertensión. Además, contienen manganeso, yodo, magnesio, cobre, hierro y fósforo. Por todo esto, el consumo de fresa está relacionado con la prevención de la inflamación, de enfermedades cardiovasculares, obesidad, síndrome metabólico, ciertos tipos de cáncer e incluso enfermedades neurológicas (Giampieri *et al.*, 2015). Por sus propiedades organolépticas la fresa es un fruto muy apreciado que se consume no solo fresco sino también en helados, mermeladas, pasteles, caramelos, entre otros preparados, e incluso en suplementos dietéticos.

En relación al metabolismo primario, la proporción entre el contenido en azúcares y el de ácidos orgánicos, así como el contenido en aminoácidos, es importante en el sabor del fruto (Fait *et al.*, 2008). Durante el desarrollo del fruto el contenido de los componentes mayoritarios del metabolismo primario, que son glucosa, fructosa y sacarosa, van aumentando (Fait *et al.*, 2008; Vallarino *et al.*, 2019). En cuanto al metabolismo secundario el contenido y variación de los compuestos fenólicos también son importantes, entre otras cosas porque proporcionan color y sabor al fruto (Aaby *et al.*, 2007). Los flavonoides como las antocianinas y flavonoles también aumentan su concentración a lo largo de la maduración, lo que hace que vaya cambiando el color y sabor del fruto (Halbwirth *et al.*, 2006; Fait *et al.*, 2008; Vallarino *et al.*, 2019). Tanto el metabolismo primario como secundario están coordinados en las primeras etapas del desarrollo entre aquenios y receptáculos, pero a lo largo del desarrollo esta coordinación entre los tejidos va disminuyendo (Fait *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos en fresa son las antocianinas, flavonoles, flavanoles y derivados del ácido elágico (Aaby *et al.*, 2007). Las antocianinas, que son las responsables del color rojo del fruto, son glucósidos de pelargonidina y cianidina, y junto con los elagitaninos son los compuestos fenólicos más abundantes en fresa (Määttä-Riihinen *et al.*, 2004; Aaby *et al.*, 2005). Los flavonoles más abundantes son quercetina y kaempferol, aunque también se encuentran en fresa otros como ácido benzoico e hidroxicinámico (Häkkinen & Törrönen, 2000; Kosar *et al.*, 2004).

La concentración de los diferentes compuestos fenólicos es importante en cuanto a la calidad organoléptica del fruto y a sus efectos antioxidantes. La cantidad de cada compuesto fenólico varían en las diferentes variedades de fresa, lugar de cultivo y grado de maduración del fruto (Kosar *et al.*, 2004).

En los diferentes estadios de maduración del fruto de fresa la cantidad de estos compuestos fenólicos va variando. Los componentes mayoritarios en los diferentes estadios son, el ácido elágico en estadio temprano, la pelargonidina-3-glucosido y el ácido *p*-cumárico en estadio maduro. El ácido elágico va disminuyendo durante la maduración, al contrario que la cianidina-3-glucosido y la pelargonadina-3-glucosido, que van aumentando en la maduración, al igual que ocurre con el ácido *p*-cumárico. En cuanto a los flavonoides, el kaempferol, quercetina y miricetina no varían de forma significativa durante la maduración (Kosar *et al.*, 2004).

Familia de proteínas Fra a 1

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la familia de proteínas Fra a 1 de *F. x ananassa*. Esta familia de proteínas se identificó en un estudio proteómico mediante espectroscopía de masas por el que, al comparar las proteínas entre variedades de fresa de fruto blanco que no causaban alergia y variedades de fruto rojo que sí lo hacían, se comprobó que en las primeras no había presencia de Fra a 1 (Hjernø *et al.*, 2006; Alm *et al.*, 2007). La familia de proteínas Fra a 1 de fresas pertenece a la superfamilia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-10) (Fernandes *et al.*, 2013). No se conoce una función común a esta superfamilia, aunque sí se han propuesto diferentes funciones para algunas de ellas. La mayoría han sido estudiadas *in vitro*, y algunas de sus funciones propuestas están relacionadas con su participación en

procesos enzimáticos, incluyendo la actividad RNAsa y la biosíntesis de metabolitos secundarios, en procesos antimicrobianos, así como en la unión, almacenaje y transporte de fitohormonas y otros ligandos hidrofóbicos (Fernandes *et al.*, 2013). Una característica común a muchas de las proteínas PR10 es que son alergénicas. La familia Fra a 1 es homóloga al alérgeno del polen de abedul Bet v 1, que también pertenece a la superfamilia de proteínas PR-10 (Muñoz *et al.*, 2010).

- **Expresión de la familia Fra a 1 en fresa**

Los miembros de esta superfamilia de proteínas suelen ser familias multigénicas (Fernandes *et al.*, 2013), y lo mismo ocurre con Fra a 1. Diversos estudios basados en el análisis de bases de datos de *Fragaria* (FAN_ r1.1_pep (Strawberry GARDEN; <http://strawberry-garden.kazusa.or.jp>)) y en la clonación de productos de amplificación por PCR han identificado 39 genes de la familia Fra a 1 que codifican 30 proteínas diferentes (Ishibashi *et al.*, 2018). Sin embargo, las secuencias depositadas en el GenBank de genes de la familia *Fra a 1* en *F. x ananassa* corresponden a 8 genes, *Fra a 1.01-Fra a 1.08* (Besbes *et al.*, 2019), con algunas variantes alélicas (Ishibashi *et al.*, 2018). La Tabla 1 identifica estos genes y su correspondencia con los genes identificados en el genoma de *F. vesca* (GDR, www.rosaceae.org, v4.0.a1). Los cDNAs de estos genes contienen 483 nucleótidos y forman proteínas de 160 aminoácidos (a excepción de *Fra a 1.03*, que contiene 480 nucleótidos y su proteína 159 aminoácidos), tienen una masa molecular en torno a 18 kDa. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de similitud que hay entre las secuencias de nucleótidos en estos genes, que está entre 72 % y 98 %, y en la Figura 5 se muestra un dendrograma basado en ese grado de similitud.

Tabla 1.- Correspondencia de los genes *Fra a 1* en el GenBank y en el genoma de *F. vesca*.

	GenBank	<i>F. vesca</i>
<i>Fra a 1.01</i>	AM236319	FvH4_4g18990
<i>Fra a 1.02</i>	GQ148818	FvH4_4g18860
<i>Fra a 1.03</i>	LC214966	FvH4_4g19050
<i>Fra a 1.04</i>	KJ507735	FvH4_4g19710
<i>Fra a 1.05</i>	KJ507736	FvH4_4g19060
<i>Fra a 1.06</i>	KJ507737	FvH4_4g19080
<i>Fra a 1.07</i>	KJ507738	FvH4_4g19700
<i>Fra a 1.08</i>	KJ507739	FvH4_4g18850

Tabla 2.- Similitud de secuencia de los diferentes genes *Fra a 1* según sus secuencias de cDNA en el *GenBank*. La similitud entre los diferentes *Fra a 1* está expresada en porcentaje.

	Fra a 1.01	Fra a 1.02	Fra a 1.03	Fra a 1.04	Fra a 1.05	Fra a 1.06	Fra a 1.07	Fra a 1.08
Fra a 1.01	100	81	76	79	80	78	72	74
Fra a 1.02		100	78	93	98	95	77	78
Fra a 1.03			100	78	78	78	86	87
Fra a 1.04				100	94	95	78	80
Fra a 1.05					100	94	77	78
Fra a 1.06						100	79	81
Fra a 1.07							100	93
Fra a 1.08								100

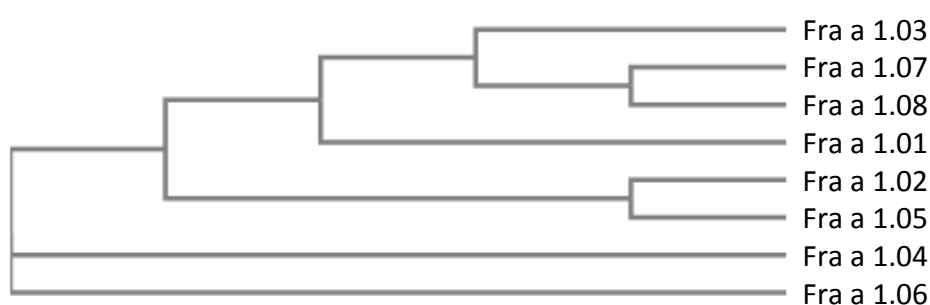


Figura 5.- Dendrograma de los diferentes genes *Fra a 1* según sus secuencias de cDNA en el *GenBank*. El alineamiento y dendrograma se ha realizado con Clustal Omega (EMBL-EBI, Madeira *et al.*, 2019).

La expresión en frutos de los primeros tres genes identificados, *Fra a 1.01*, *Fra a 1.02* y *Fra a 1.03* (Muñoz *et al.* 2010), se estudió inicialmente por qRT-PCR mostrando que *Fra a 1.01* y *Fra a 1.03* tenían la mayor expresión en los frutos verdes, mientras que *Fra a 1.02* mostraba la mayor expresión en frutos rojos, presentando el máximo de expresión entre todos los tejidos estudiados (Muñoz *et al.*, 2010). Este patrón de expresión para los tres genes *Fra a 1* fue confirmado a nivel de proteína mediante *western blots* (Casañal, 2014).

Posteriormente, el análisis por RNA-seq del transcriptoma en el receptáculo y achenios por separado a lo largo de la maduración cuantificó el nivel de transcritos de todos los genes *Fra a 1* que se expresaban en este órgano (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). Para el mapeo de las lecturas de RNA-seq se utilizó el genoma de *F. vesca* (v4.0.a.1) (Edger *et al.*, 2018). Los resultados de este estudio (Figura 6) confirmaron los patrones de expresión de *Fra a 1.01* – *Fra a 1.03* previamente estudiados por qRT-PCR y *western blot* (Muñoz *et al.*, 2010 y Casañal, 2014). También permitieron comprobar que

había otros genes de la familia *Fra a 1* que también se expresan en frutos, aunque a menor nivel (Figura 6). En aquenios, los genes *Fra a 1* muestran también una expresión relativamente elevada, con un patrón diferente al receptáculo a lo largo de la maduración, siendo *Fra a 1.01* y *Fra a 1.03* los de mayor expresión, con máximos en los estadios blanco e intermedio, respectivamente (Figura 7).

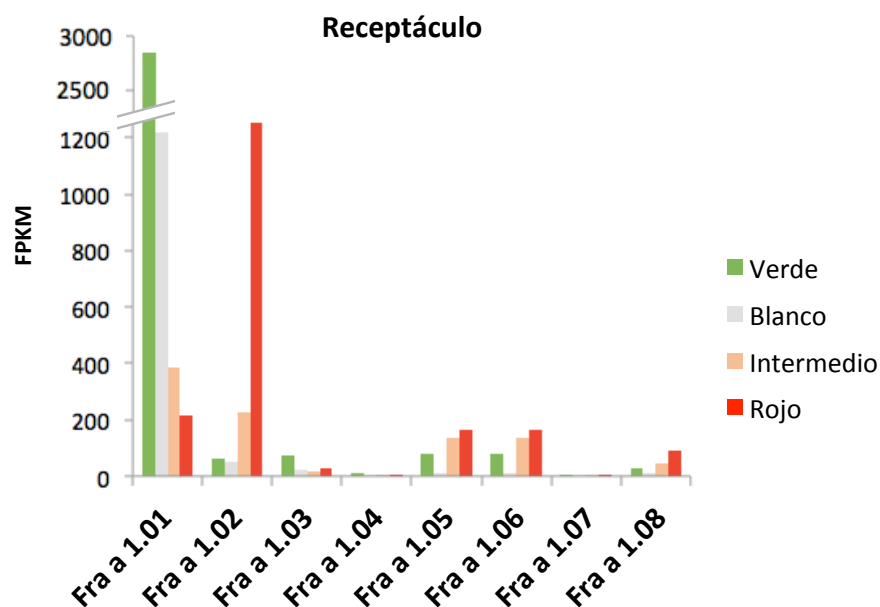


Figura 6.- Expresión de los diferentes genes *Fra a 1* en receptáculo a lo largo de la maduración de fresa. Datos tomado de Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017.

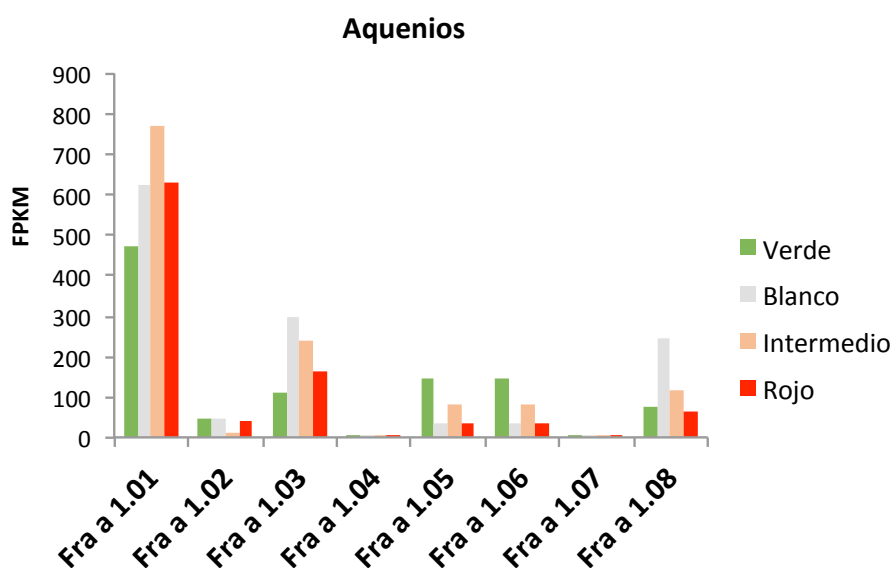


Figura 7.- Expresión de los diferentes genes *Fra a 1* en aquenios a lo largo de la maduración de fresa. Datos tomado de Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017.

El presente trabajo se va a centrar en *Fra a 1.02*, ya que es el componente de la familia *Fra a 1* que se expresa más en el receptáculo del fruto rojo, lo que le da un valor adicional por ser el estadio importante para el consumo humano.

- **Estudio de la función de *Fra a 1***

La función de las proteínas *Fra a 1* en el fruto de fresa es aún desconocida, más allá de su pertenencia a la familia de las proteínas PR10, asociadas en general a la respuesta a patógenos. Inicialmente se postuló que estas proteínas estaban involucradas en la síntesis de flavonoides, pues el estudio proteómico anteriormente mencionado mostraba que en variedades blancas había un bajo contenido estas proteínas en relación a los frutos de variedades rojas (Hjernø *et al.*, 2006; Alm *et al.*, 2007). Además, el silenciamiento transitorio de *Fra a 1.01*, *Fra a 1.02* y *Fra a 1.03* en frutos de fresa produjo una disminución de las antocianinas más abundantes, con un fenotipo de pérdida de color (Muñoz *et al.*, 2010). Sin embargo, Kaiser *et al.*, (2015) y Kurze *et al.*, (2018) concluyeron que la cantidad de proteínas *Fra a 1* presente en los frutos no estaba correlacionada directamente con el color de los mismos, ya que diferentes niveles de expresión de *Fra a 1* en diversas variedades, tanto rojas como blancas, no se correspondían con su contenido en flavonoides.

Recientemente se ha publicado que algunas proteínas *Fra a 1* presentan actividad RNasa dependiente de su estado de fosforilación (Besbes *et al.*, 2019). En este estudio se estudiaron las proteínas *Fra a 1.04*, *Fra a 1.05*, *Fra a 1.06*, *Fra a 1.07* y *Fra a 1.08*, y comprobaron que son fosforiladas *in vitro* excepto *Fra a 1.06*, que a su vez es la única que tenía actividad RNasa. El resto presentaban actividad RNasa solo cuando eran defosforiladas. Esta actividad RNasa se propone que está relacionada con una posible función de *Fra a 1.06* en la defensa frente a patógenos, tal como se ha encontrado en otras proteínas PR-10.

Debido a que se desconoce la función que la proteína *Fra a 1.02* desempeña en el fruto de fresa, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue intentar ampliar el conocimiento de esta familia de proteínas *Fra a 1* con la intención de dilucidar el papel que ejerce en el fruto de fresa.

- **Características estructurales de *Fra a 1***

La estructura de las proteínas PR-10 está conservada y consta de tres hélices α y siete láminas β antiparalelas, formando una cavidad hidrofóbica capaz de unir ligandos, que podrían estar relacionados con su función molecular aún desconocida (Fernandes *et al.*, 2013).

Las proteínas PR-10 tienen capacidad de unión a ligandos en su cavidad hidrofóbica. Esta cavidad varía en forma y volumen entre las diferentes proteínas PR-10, lo que permite que cada tipo de PR-10 pueda unir ligando diferentes (Fernandes *et al.*, 2013). En el caso de las proteínas Fra a 1 se conoce el ligando de algunas de ellas. Así, Fra a 1.01, Fra a 1.02 y Fra a 1.03 tienen capacidad de unir flavonoides con diferente selectividad y con una afinidad en el rango μM : Fra a 1.01 une quercetina-3-O-glucuronido, Fra a 1.02 miricetina y Fra a 1.03 (+)-catequina, con constantes de disociación de 5,3 μM , 19,5 μM y 8,9 μM , respectivamente (Casañal *et al.*, 2013a).

Las estructuras tridimensionales de Fra a 1.01 y de Fra a 1.03 se han podido resolver, ésta última unida a catequina (Figura 8, Casañal *et al.*, 2013a). Las dos proteínas presentan una alta homología estructural con las proteínas PR-10 (Fernandes *et al.*, 2013). Los aminoácidos que se encuentran en la cavidad donde se une el ligando están conservados en las proteínas Fra a 1, pero hay ligeros cambios en la conformación global de las proteínas que pueden ser la causa de la selectividad frente a los diferentes ligandos (Casañal *et al.*, 2013a).

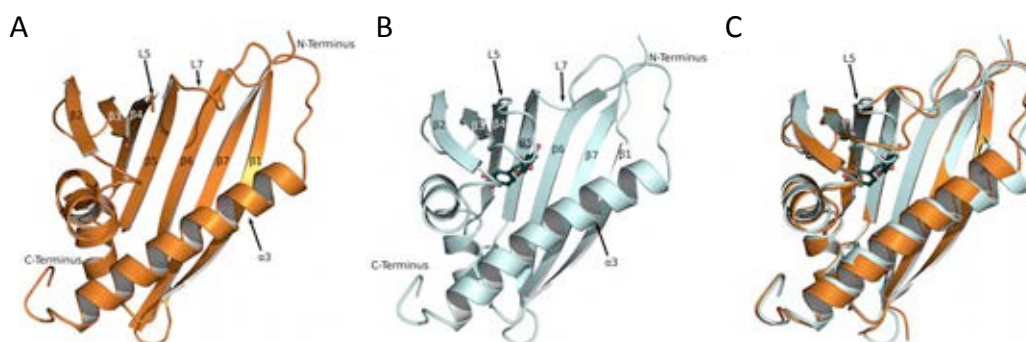


Figura 8.- Representación estructural de las proteínas Fra a 1.01, Fra a 1.03 unida a (+)-catequina y la superposición de ambas. A) Representación en cintas de Fra a 1.01. **B)** Representación en cintas de Fra a 1.03 en unión a una molécula de (+)-catequina. **C)** Ambas estructuras superpuestas. Figura tomada de Casañal *et al.*, 2013a.

En algunas de estas proteínas PR-10 se ha podido comparar la conformación estructural de la proteína con y sin unión a ligando, y en algunos casos, como en el de la enzima norcoclaurina sintasa (NCS), no se apreciaron cambios conformacionales como resultado de la unión del ligando (dopamina y 4-hidroxibenzaldehído) (Ilari *et al.*, 2009). En otros casos, como en Bet v 1a, se han visto pequeños cambios conformacionales en la estructura de la proteína debido a la presencia de ligandos (nanigerina y kinetina) (Fernandes *et al.*, 2013). En algunos casos se ha visto un cambio importante en la conformación proteica debido a la presencia de ligando, como es el caso de la comparación de dos lupinas con una alta homología, L1PR-10.2A sin ligando y L1PR-10.2B unida a zeatina (Fernandes *et al.*, 2013). Uno de los ejemplos de proteína PR-10 en los que mejor se conoce el cambio de conformación debido a la unión del ligando es el de la familia de proteínas PYL/PYR/RCAR, que actúan como receptor del ácido abscísico (ABA) (Park *et al.*, 2009). Cuando PYL2, uno de los miembros de esa familia, se encuentra unido a su ligando, el ABA, cambia la conformación de dos lazos (*loops, L*) que cierran la cavidad, actuando como una puerta (el L5) y un pestillo (el L7) (Figura 9) (Melcher *et al.*, 2009). En el caso de esta proteína, este cambio conformacional por la unión del ligando tiene una relevancia funcional importante, pues hace posible la unión de una proteína interactora, la fosfatasa tipo 2C (PP2C) (Melcher *et al.*, 2009). La unión de la proteína PP2C al complejo PYL2-ABA se produce en el sitio activo de PP2C, por lo que la formación del complejo inhibe su función, lo que desencadena la cascada de señalización en respuesta a ABA. Por lo tanto, el cambio conformacional provocado por la unión de ABA, que tiene lugar sobre todo en el lazo L5, crea una superficie en la que PP2C puede unirse y se produce su inhibición directa. La interacción de PP2C con el receptor se produce en respuesta a ABA (Park *et al.*, 2009).

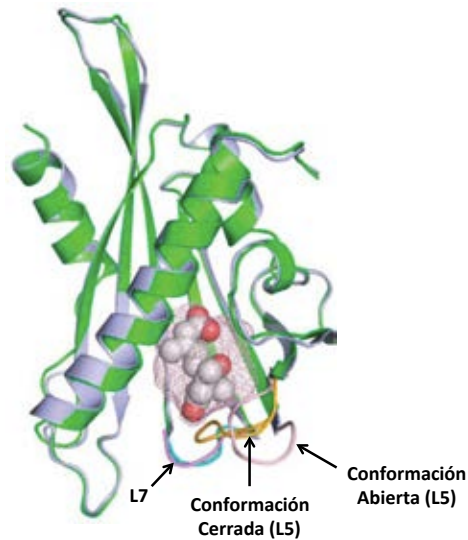


Figura 9.- Superposición del receptor PYL2 y PYL2-ABA. Representación en cintas de PYL2 (gris) y de PYL2-ABA (verde), representación en esferas de ABA y representación de la cavidad en forma de malla. Los *loops* 5 (L5) y 7 (L7) se muestran en las conformaciones abierta en PYL2 (rosa y magenta, respectivamente) y cerradas en PYL2-ABA (amarillo y cian, respectivamente). Imagen modificada de Melcher *et al.*, 2009.

En las proteínas Fra a 1 también parece que ocurre un cambio conformacional de la estructura cuando se produce la unión a un ligando, ya que al comparar las estructuras de Fra a 1.01 sin ligando y Fra a 1.03 unida al ligando (+)-catequina (Figura 10) se puede ver que las mayores diferencias estructurales se encuentran en los lazos L3, L5 y L7 (Casañal *et al.*, 2013a). El mayor cambio se observa en L5, que en el caso de Fra a 1.03 unido a (+)-catequina se encuentra en una conformación cerrada, formando una estructura compacta con la (+)-catequina dentro de la cavidad. La cavidad de Fra a 1.03 también muestra una reducción del volumen al compararla con la de Fra a 1.01 (1646,4 Å de Fra a 1.03 frente a 32204,8 Å de Fra a 1.01), que podría deberse a la unión del ligando o a una diferencia estructural de ambas.

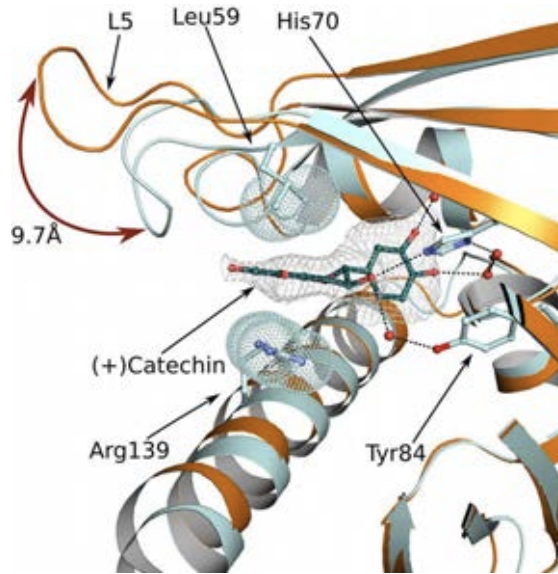


Figura 10.- Superposición de Fra a 1.01 y Fra a 1.03-(+)-catequina. Representación de cintas de la zona de la cavidad de Fra a 1.01 en cian y Fra a 1.03 en naranja. La representación de la (+)-catequina y de las cadenas laterales de los aminoácidos que intervienen en la unión con la (+)-catequina (aminoácidos 59,70,84 y 139) se muestran en representación de bastones y esferas. Las esferas de Van der Waals de las cadenas laterales de los aminoácidos 59 y 139 están representados con puntos. La malla en torno a la (+)-catequina corresponde a la densidad electrónica (tomado de Casañal *et al.*, 2013a).

La proteína Fra a 1.03 muestra una alta homología estructural con uno de los receptores de la familia PYR/PYL/RCAR de ABA, PYR1, como se puede ver en la Figura 11 donde ambos están representados con su ligando, siendo esa su conformación cerrada.

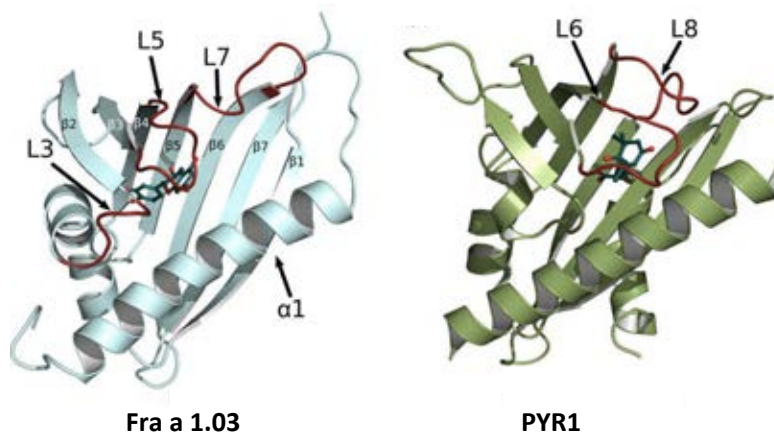


Figura 11.- Estructuras de Fra a 1.03-(+)-catequina y PYR1-ABA. Representación en cintas de Fra a 1.03 (cian) y el receptor de ABA, PYR1 (verde), y representación en bastones y esferas de (+)-catequina y ABA. Modificado de Casañal *et al.*, 2013a.

Con estas observaciones se puede establecer la hipótesis de que las proteínas Fra a 1 se podrían comportar como el receptor de ABA, capaz de unir un ligando, que una vez unido cambia la conformación de la proteína y esto permite que se le una una proteína interactora. El conocimiento de esa proteína interactora podría arrojar luz sobre la posible función molecular de Fra a 1. Por lo tanto, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue encontrar esa posible proteína interactora, y que contribuiría a conocer el modo de acción de Fra a 1.02.

- **Alergenicidad**

Desde el punto de vista del consumo humano, se ha reportado la existencia de una hipersensibilidad a los frutos de fresa. Este efecto se ha explicado en muchos casos por la reactividad cruzada de las proteínas Fra a 1 con los anticuerpos desarrollados frente a la proteína Bet v 1, el principal alérgeno del polen de abedul (Valenta & Kratf, 1996). La alergia al polen de abedul es muy frecuente en países del centro y norte de Europa y norte de América, y también es muy frecuente que estos pacientes presenten alergias por reactividad cruzada a proteínas estructuralmente similares a Bet v 1 presentes en verduras, frutos y nueces. La proteína Bet v 1 también pertenece a la familia de las PR10, y presenta una alta similitud estructural con las proteínas Fra a 1 (Casañal *et al.*, 2013a). Por este motivo se ha estudiado la posible alergenidad de estas proteínas Fra a 1 presentes en el fruto de fresa. Así, en un estudio de activación de basófilos se ha comprobado que las proteínas Fra a 1.02 y Fra a 1.03 *per se* muestran activación de basófilos en un 73 y 66 % del total de basófilos, respectivamente (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016). Más recientemente, se ha evaluado la capacidad de reconocimiento de diferentes proteínas Fra a 1 por la IgE presente en plasma o suero de pacientes alérgicos al polen de abedul (Ishibashi *et al.*, 2018). La máxima reactividad ocurría con Fra a 1.01, aunque también había reactividad cruzada con Fra a 1.02 y Fra a 1.03. Fra a 1.01 es más abundante en fruto verde y va disminuyendo su expresión a lo largo de la maduración, por lo tanto en estadio rojo, que es el que se consume, el mayor alérgeno sería Fra a 1.02, que es segundo con mayor reactividad. Por ello se considera

que Fra a 1.02 es el principal responsable de la alergia a fresa en en pacientes alérgicos al polen de abedul.

El presente trabajo también tiene como objetivo el estudio de las bases moleculares de esta alergia a fresa mediada por Fra a 1.02 y que es debida a la reactividad cruzada de las IgE producidas por Bet v 1.

Capítulo 2: Objetivos

Objetivo principal: Conocer la función que las proteínas Fra a 1, en general, y Fra a 1.02, en particular, desempeñan en el fruto de fresa.

Este objetivo se pretende cumplir mediante los siguientes objetivos específicos:

1.- Encontrar los posible interactores proteicos de las proteínas Fra a 1.01 y Fra a 1.02 que pudieran dar información sobre la acción molecular y la función de estas proteínas en el fruto de fresa.

Los resultados obtenidos en la ejecución de este objetivo se recogen en el capítulo 3.

2.- Conocer la función de *Fra a 1.02* en el fruto de fresa mediante la generación de líneas transgénicas de fresa que silencien este gen, y el posterior fenotipado y análisis metabólico y transcriptómico.

Los resultados obtenidos en la ejecución de este objetivo se recogen en el capítulo 4.

3.- Determinar la estructura de Fra a 1.02 para analizar sus diferencias estructurales con las otras Fra a 1 mayoritariamente expresadas en frutos, Fra a 1.01 y Fra a 1.03

4.- Determinación de los epitopos responsables de la respuesta alérgica a Fra a 1.02 debida a una alergia inicial a Bet v 1.

Los resultados obtenidos en la ejecución de los objetivos 3 y 4 se recogen en el capítulo 5.

Capítulo 3: Búsqueda de la proteína interactora de Fra a 1

Teniendo en cuenta la similitud estructural de las proteínas Fra a 1 con el receptor del ABA, la capacidad de estas proteínas de unir ligandos presentes en el fruto de fresa, y el hecho de que la conformación estructural de Fra a 1.03 unida a catequina es similar a la conformación cerrada de PYR1 unido a ABA, se podría pensar que la actividad molecular de las proteínas Fra a 1 estaría mediada por la unión a un ligando y a una proteína efectora. Este modelo supondría un cambio importante en el conocimiento de la función, hasta ahora desconocida, de estas proteínas Fra a 1 en el fruto de fresa. Por este motivo, se inició la búsqueda de una proteína interactora de Fra a 1, y esto se llevó a cabo empleando las estrategias de doble híbrido y coimmunoprecipitación no dirigida.

Búsqueda de la proteína interactora de Fra a 1 mediante doble híbrido en levaduras

El doble híbrido es una técnica *in vivo* efectiva de búsqueda de interacciones entre proteínas que sirve para comprobar interacciones predichas o encontradas por otras técnicas, o para buscar la interacción de una proteína con otra entre una batería de proteínas, como por ejemplo las obtenidas a partir de una genoteca de cDNA (Koegl *et al.*, 2008). En el caso de este estudio, se buscaba encontrar, mediante la estrategia del doble híbrido, las proteínas interactoras de Fra a 1.01 y Fra a 1.02, que son las más expresadas en fruto (Muñoz *et al.*, 2010; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017), entre las proteínas producidas a partir de genotecas de cDNA de frutos de fresa en estadio verde y rojo, respectivamente, ya que Fra a 1.01 es más abundante en estadio verde y Fra a 1.02 en estadio rojo (Casañal, 2013a).

El método se basa en la reconstitución de un factor de transcripción (Gal4) que regula la expresión de un gen indicador (Figura 12). El factor de transcripción consta de dos dímeros, uno de ellos, que se une al DNA (Gal4-BD, por Binding Domain), está fusionado a la proteína de interés (cebo o *bait*) (Fra a 1.01, 1.02 y 1.03, en este caso), y

otro dominio de activación (Gal4-AD, por Activation Domain) está fusionado a la proteína para la que se quiere testar la interacción (presa o *prey*) (producto de expresión de la genoteca de cDNA en este caso) (Fields & Song, 1989). Si se produce una interacción entre las proteínas fusionadas a cada uno de los monómeros éstos se unen y se produce la activación de la transcripción del gen indicador, que puede ser por ejemplo un gen que revierte la auxotrofia para algún aminoácido, como el *HIS3*, que permitiría que la levadura, inicialmente auxótrofa para la histidina (His), pueda crecer en un medio sin este aminoácido. Si bien esta técnica ha sido ampliamente usada con éxito, no está exenta de la producción de falsos positivos (Xing *et al.*, 2016; Lin & Lai, 2017).

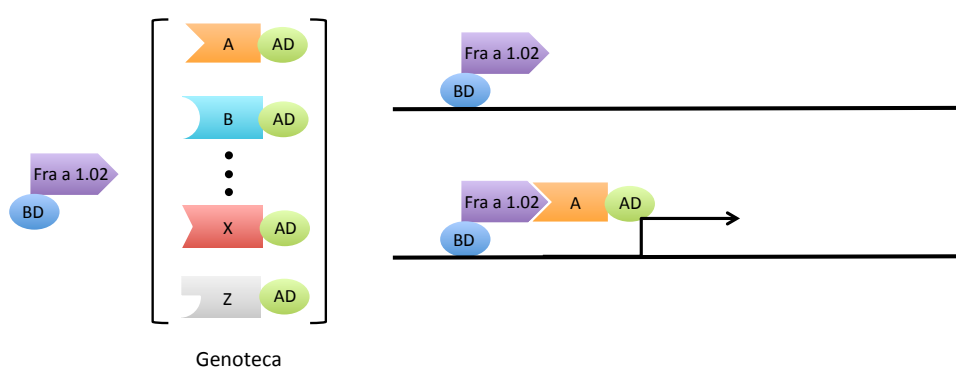


Figura 12.- Esquema del funcionamiento del doble híbrido. BD: binding domain; AD: activation domain; A, B,..X, Z: proteínas hipotéticas de la genoteca unidas al AD; La raya negra representa el DNA al que se une el BD, y la flecha representa la expresión de un gen cuando BD y AD están próximos entre sí.

En la cepa de levaduras usada en este trabajo, *Saccharomyces cerevisiae* PJ696, se emplean como genes indicadores los de síntesis de adenina (Ade) y de histidina (His), cuando se usa este último se añade siempre 3-AT, que es un inhibidor competitivo del gen *HIS3*, ya que la levadura puede tener un bajo nivel de este gen aunque sea auxótrofa para él, la adición de este compuesto impide que esto produzca falsos positivos. Así todas las levaduras co-transformadas con los plásmidos que contienen las proteínas *bait* y *prey* crecerán en el medio +His +Ade, pero solo aquellas en las que se produzca una interacción entre estas proteínas crecerán en medio –His +Ade +3-AT. Si esta interacción es fuerte, las levaduras podrán crecer en medio +His -Ade y en medio –His –Ade +3-AT.

Comprobación de autoactivación y toxicidad de Fra a 1 en levaduras

Los primeros intentos para llevar a cabo los experimentos de doble híbrido se realizaron empleando los vectores pDEST32 (donde estará clonado el gen *bait*, *Fra a 1*, fusionado al BD de *Gal4*) y pDEST22 (donde estarán clonados los genes que serán el *prey*, fusionado al AD de *Gal4*). Ambos vectores son de Invitrogen. Se empleó este sistema debido a que las genotecas de fresa estaban clonadas en pDEST22. Como control positivo del experimento se empleó la interacción conocida entre el antígeno T (AgT) y el gen supresor de tumores p53, y como control negativo, la no interacción entre AgT y laminina C (LamC) (interacciones descritas en Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual).

Una vez clonados los genes *Fra a 1* en el vector *pDEST32* (*pDEST32-Fra a 1*) se procedió a comprobar si la expresión de estos genes resultaba tóxica para las levaduras, o si eran capaces de autoactivar el sistema de doble híbrido por si solas sin la presencia de ningún interactor (Figura 13). Para ello, se co-transformaron las levaduras con los vectores *pDEST32-Fra a 1*, y los vectores *pDEST22* con el dominio de activación de la transcripción (AD), pero en este caso vacíos. También se incluyeron los controles positivo y negativo de interacción.

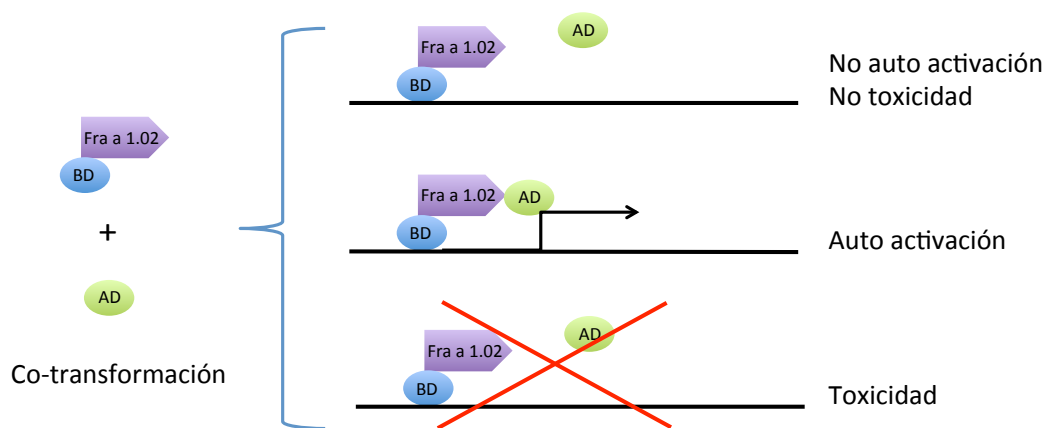


Figura 13.- Esquema de prueba de auto activación y toxicidad de Fra a 1 en levaduras. BD: binding domain; AD: activation domain; La raya negra representa el DNA al que se une el BD, y la flecha representa la expresión de un gen cuando BD y AD están próximos entre sí.

Se puede comprobar en la Figura 14 que todas las colonias sembradas en todas las diluciones crecen en el medio +His +Ade, por lo que se puede concluir que las proteínas Fra a 1 no son tóxicas para esta cepa de levaduras ya que no hay ninguna diferencia de crecimiento con respecto a los controles. También se puede observar que

en los demás medios, que son los medios que seleccionan la interacción, no ha crecido ninguna colonia salvo el control positivo.

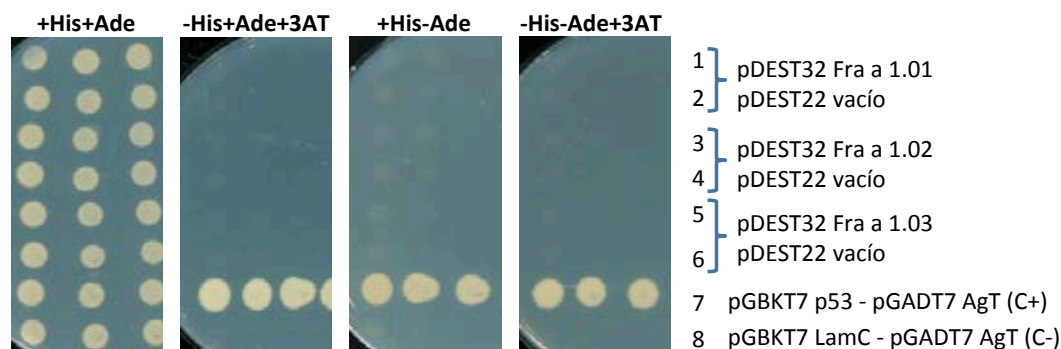


Figura 14.- Comprobación de la autoactivación y toxicidad. Las levaduras co-transformadas con las construcciones que se pueden observar a la derecha de la Figura están sembradas en 4 medios diferentes de selección, que se indican en la parte superior. Las placas están crecidas 5 días a 28°C y se sembraron 5 diluciones seriadas 10^{-1} , aunque solo están representadas las tres más concentradas.

Para comprobar que las proteínas Fra a 1 son capaces de expresarse en levaduras y que la ausencia de toxicidad y de autoactivación no se debían a que las proteínas no se estaban expresando, se hicieron experimentos de *westerns blot* empleando extractos de proteínas obtenidos a partir de las levaduras co-transformadas con *pDEST32-Fra a 1* y el plásmido *pDEST22* vacío y con un anticuerpo policlonal anti-Fra a 1.02. Debido a la baja expresión de la proteína de fusión Fra a 1-Gal4 y a la aparición de bandas inespecíficas, no se logró determinar si las proteínas se estaban expresando correctamente (datos no mostrados). Para intentar solventar este problema, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Gal4-BD, que sí permitió la detección de una banda de 37,9 kDa, correspondiente al tamaño de la fusión Fra a 1.03 y Gal4-BD, en las calles donde se cargó la extracción de proteínas de las levaduras transformadas con Fra a 1.03 (Figura 15, panel superior). Para poder detectar las bandas correspondientes a Fra 1.01 y Fra 1.02 fue necesario aumentar el contraste al máximo (Figura 15, panel intermedio).

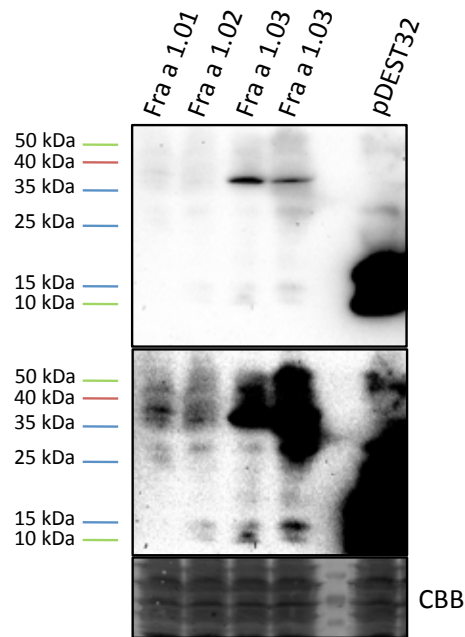


Figura 15.- Expresión de las proteínas Fra a 1.01, Fra a 1.02 y Fra a 1.03 en levaduras con el sistema Invitrogen. *Western blot* antiGal4-BD correspondiente a las extracciones de proteínas provenientes de cepas de levadura transformadas con las distintas *Fra a 1* en el plásmido *pDEST32* y el plásmido *pDEST22* vacío. La última calle corresponde a la extracción de proteínas de una cepa de levaduras transformada con *pDEST32* y *pDEST22* vacíos. Fra a 1.03 está representado dos veces porque corresponde a dos colonias de la misma cepa de levaduras. Las imágenes superior y media tienen la misma exposición pero en esta última el contraste está al máximo para apreciar las bandas de Fra a 1.01 y Fra a 1.02. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. Los tamaños estimados de las proteínas de fusión son: Fra a 1.01-Gal4BD 38,2 kDa, Fra a 1.02-Gal4BD 37,9 kDa, Fra a 1.03-Gal4BD 37,9 kDa y Gal4BD 22 kDa. Anticuerpo anti-Gal4-BD

Con estos resultados podemos concluir que en estos plásmidos las proteínas de fusión de Fra a 1.01, 1.02 y 1.03 son capaces de expresarse en levaduras, aunque a un bajo nivel, que no son tóxicas en levaduras y que no son capaces de activar por sí solas los genes responsables del proceso de selección del doble híbrido, y por tanto necesitan la interacción con una proteína para poder crecer en los diferentes medios de selección. Estos dos resultados permitieron seguir con el proceso de búsqueda de interactores por el sistema de doble híbrido. Finalmente, para la búsqueda mediante doble híbrido solo se usaron *Fra a 1.01* y *Fra a 1.02* ya que son los más abundantes en estadio verde y rojo respectivamente (Casañal, 2014).

Las genotecas de cDNA de fresa en *pDEST22* están contaminadas con clones que autoactivan el sistema

Una vez comprobado que las proteínas Fra a 1 no eran tóxicas para la cepa de levaduras empleada, que no autoactivaban el sistema y que se estaban expresando, se comenzó con las co-transformaciones con las diferentes *Fra a 1* y las genotecas de fresa. Se hicieron un total de 7 co-transformaciones de la genoteca de fruto verde con *Fra a 1.01* en las que se obtuvieron 63 posibles positivos y 12 co-transformaciones de la genoteca de fruto rojo con *Fra a 1.02* de las que se obtuvieron 278 posibles positivos. Se escrutaron un total de $1,8 \times 10^6$ clones en la combinación de genoteca de fruto verde y *Fra a 1.01* y un total de $3,1 \times 10^6$ clones en el caso de la genoteca de fruto rojo y *Fra a 1.02*. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las transformaciones realizadas, incluyendo las eficiencias de transformación y los posibles positivos obtenidos en cada transformación.

Tabla 3.- Resumen de las transformaciones realizadas empleando el sistema de doble híbrido de Invitrogen.

Nº Transformaciones	Genoteca - Fra a 1	Sistema	Eficiencia	Posibles positivos
4	Fruto rojo - Fra a 1.02	Invitrogen	$2,1 \times 10^6$	251
1	Fruto verde Fra a 1.01	Invitrogen	$7,7 \times 10^5$	28

Los posibles positivos de las dos primeras transformaciones de genoteca de frutos rojos y *Fra a 1.02* (un total de 171) se analizaron para comprobar si eran verdaderos positivos. Para ello, se extrajo el DNA de las levaduras, se transformó *E. coli* y se analizaron 5 colonias de cada posible positivo mediante ensayos de restricción. Así, se pudo comprobar que todos los clones tenían dos patrones de restricción diferentes, lo que indicaba que provenían de dos plásmidos diferentes. También se vio que había dos patrones de restricción que se repetían en diferentes posibles positivos, de forma que cada posible positivo tenía uno de esos patrones o el otro, y siempre acompañado de otro patrón de banda diferente (Figura 16). Estos patrones repetidos se nombraron como recombinante 1 (R1) y recombinante 2 (R2). En la Figura 16 se puede ver un ejemplo de esto en dos posibles positivos en los que uno tiene un patrón de restricción R1 y el otro R2, acompañando a otro plásmido.

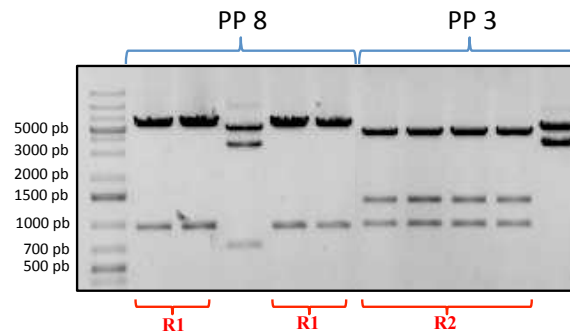


Figura 16.- Análisis de restricción de dos de los posibles positivos. En la parte superior se indican los posibles positivos (PP) y en la parte inferior los distintos recombinantes encontrados (R1 y R2). La restricción fue hecha con las enzimas *SacII* y *KpnI*.

El análisis de restricción mostró que esos plásmidos recombinantes no eran *pDEST22* porque, en el caso de serlo, la banda superior al cortar con las enzimas *SacII* y *KpnI* debería ser de 5157 pb mientras que la banda superior que aparece en R1 es superior a este tamaño y la de R2 es ligeramente inferior, por lo que se pensó que podía ser una recombinación del plásmido o que fueran plásmidos contaminantes de la genoteca. Se analizaron 14 posibles positivos más y se vio que todos tenían R1 o R2 como patrones de restricción, como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4.- Repetición de patrones de restricción en los diferentes posibles positivos. Se muestra el número de colonias de *E.coli* que tenían los patrones R1 o R2 en las 5 colonias que fueron analizadas para cada posible positivo, mediante una restricción con *SacII* y *KpnI*. La columna del clon de la genoteca hace referencia al número de colonias que tienen un plásmido que no es R1 ni R2, que, por lo tanto es un clon normal de la genoteca.

Possible positivo	R1	R2	Clon genoteca
1	2/5	-	3/5
2	2/5	-	3/5
3	-	4/5	1/5
4	-	4/4	-
5	3/4	-	1/4
6	1/5	-	4/5
7	2/5	-	3/5
8	4/5	-	1/5
9	1/5	-	4/5
10	-	2/5	3/5
13	3/3	-	-
65	-	1/5	4/5
66	3/5	-	2/5
70	4/5	-	1/5

Posteriormente, se re-transformaron levaduras con los plásmidos que presentaban los patrones R1 y R2 y se vio que estos tenían la capacidad de autoactivar el sistema, pues eran capaces de crecer en el medio selectivo -His +Ade +3AT cuando se transformaban conjuntamente con el plásmido AD vacío. Cuando la transformación se hacía con otros plásmidos de la genoteca, no se observaba crecimiento en ninguno de los medios selectivos. En la Figura 17 se puede ver un ejemplo con el posible positivo 6, que en la colonia 1 (PP6.1) tiene un plásmido normal de la genoteca pero que en la colonia 3 (PP6.3) tiene el plásmido recombinante R1. En la Figura 17A se puede ver que no hay crecimiento de PP6.1 cuando está co-transformado con *Fra a 1.02*, mientras que la colonia 6.3 es capaz de crecer tanto cuando está co-transformado con *Fra a 1.02* (Figura 17A) como cuando lo está con el plásmido vacío (Figura 17B, recuadro rojo). En ningún caso se observó el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos recombinantes en los medio de selección más restrictivos, -His -Ade +3AT y +His -Ade (Figura 17A). Esto confirma la autoactivación del sistema de doble híbrido por parte de los contaminantes R1 y R2.

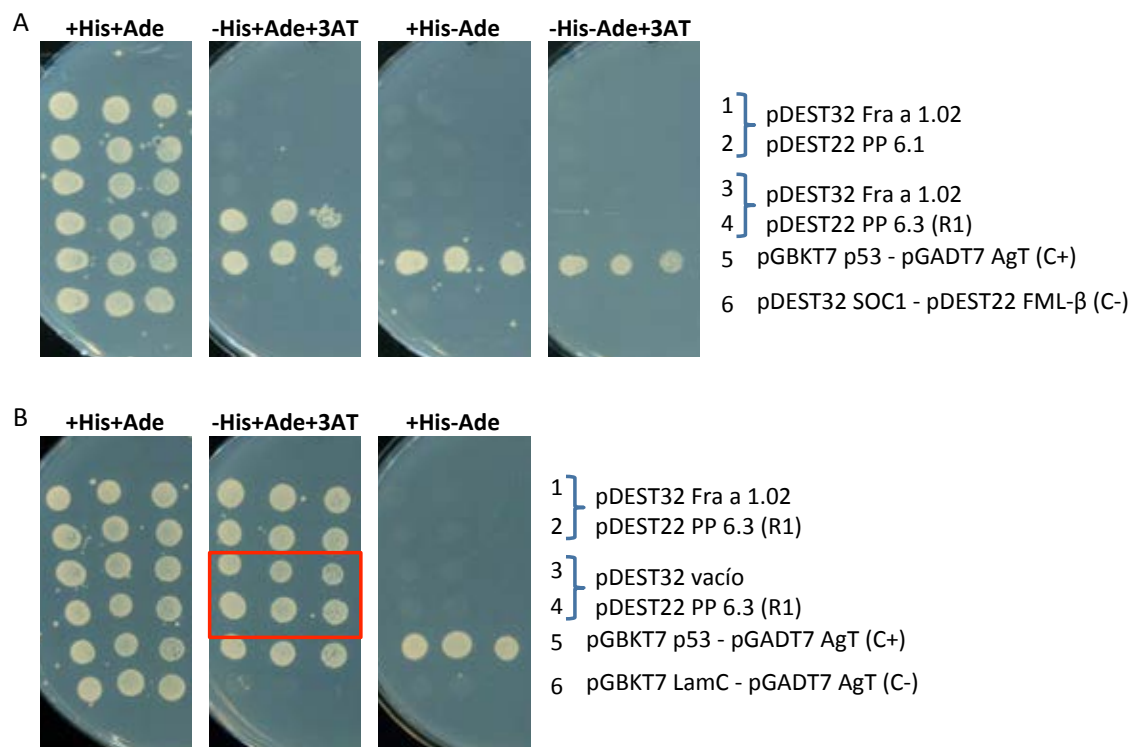


Figura 17.- Prueba de autoactivación de un posible positivo con R1. Crecimiento de levaduras co-transformadas y sembradas en 4 medios diferentes de selección, que se indican en la parte superior. **A)** Co-transformación de Fra a 1.02 con PP6.1 y con PP6.3. **B)** Co-transformación PP6.3 tanto con Fra a 1.02 como con el plásmido vacío. El recuadro rojo pone de manifiesto las colonias del contaminante R1

que han crecido en un medio selectivo (sin His) estando co-transformado con el plásmido vacío. Las placas están crecidas 5 días a 28°C y se sembraron 5 diluciones seriadas 10^{-1} , aunque están representadas solamente las tres más concentradas.

Al comprobar que las levaduras transformadas con los plásmidos recombinantes no eran capaces de crecer en los medios selectivos más restrictivos, se sembraron todos los posibles positivos en placas de medio selectivo +His –Ade y no creció ninguna colonia. También se hizo una nueva transformación con la genoteca que se sembró directamente en placas de medio selectivo +His –Ade, no creciendo ningún posible positivo. Hay que indicar, que este no es un buen método de eliminación de los recombinantes porque también se pueden estar perdiendo algunas verdaderas interacciones débiles que solo pueden crecer en el medio selectivo -His +Ade +3AT.

Se mandaron, por tanto, a secuenciar los posibles positivos identificados como R1 y R2 (Figura 18, Figuras S1 y S2). El análisis de las secuencias mostró que no eran clones de fresa en *pDEST22*, sino que se trataba de otros plásmidos, posiblemente de levaduras porque contenían un promotor (MET17) y un terminador (CYC1) de levaduras. En las secuencias se identificaba un fragmento de EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*, Proteína Fluorescente Amarilla) de un vector de integración pYFP Star (GenBank: KJ411637.1). Además, cada uno tenía un clon diferente entre sus sitios attB1 y 2, siendo *FBP1* (GenBank: X81852) en el caso de R1 y *FBP2* (GenBank: M91666.1) en el de R2. Ambos genes corresponden a Factores de Transcripción (TFs) de *Petunia x hybrida*. Por lo tanto, se concluyó que eran contaminaciones que había en la genoteca.

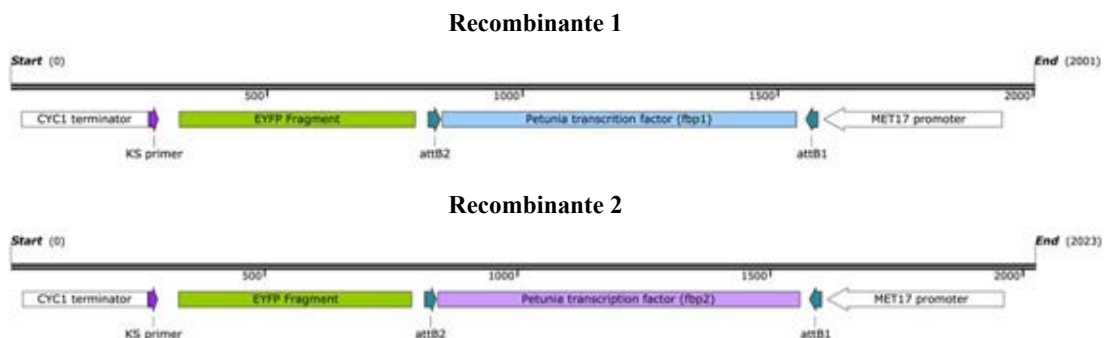


Figura 18.- Mapa de los recombinantes 1 y 2. El mapa está hecho con el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com) sobre las secuencias recogidas en las Figuras S1 y S2.

Para comprobar que las genotecas eran de fresa con algunos contaminantes y no genotecas de petunia completas, se hizo una PCR de las genotecas con oligonucleótidos propios de fresa, correspondientes a los genes *FaGADPH*, *FaActin*, *FaCHP1* (Clancy *et al.*, 2013) y *Fra a 1.02*. En la Figura 19 se puede ver que hay amplificación con todos los oligonucleótidos de fresa, así que las genotecas son de fresa, pero están contaminadas con al menos dos plásmidos que contenían genes de petunia. Se puede ver que en la PCR de *FaGADPH* hay una pequeña contaminación, pues sale banda en el control negativo, pero la banda de las genotecas es mucho más intensa.

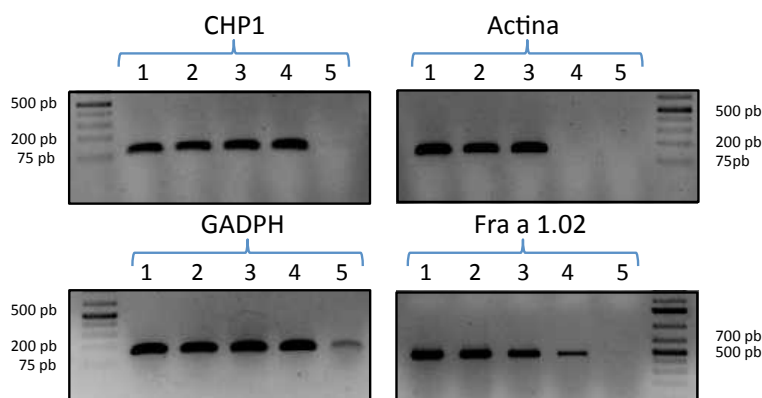


Figura 19.- PCR con oligonucleótidos de fresa para comprobar la composición de las genotecas. Las calles 1 y 2 corresponden a las diluciones 1/100 y 1/1000 respectivamente de la genoteca de fruto rojo, las calles 3 y 4 corresponden a las diluciones 1/100 y 1/1000 respectivamente de la de fruto verde, y la calle 5 es el control negativo (agua). Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron 91pb el de *FaCHP1*, 129pb el de *FaActina*, 132pb el de *FaGADPH* y 483pb el de *FaFra a 1.02*.

Para comprobar que se trataba de genotecas de fresa también se mandaron a secuenciar varios de los plásmidos que no eran R1 ni R2. Las secuencias obtenidas, cuando se buscaron homologías en el GenBank, daban la mayor identidad con los siguientes genes :

- *Chalcone synthase (Fragaria x ananassa)*
- *Shikamate O-hidroxicinamoyltransferase-like (Fragaria vesca subsp. vesca)*
- *Thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferas1, mitochondrial-like (Fragaria vesca subsp. vesca)*
- *Phosphoglycosate mutase-like protein 1 (Fragaria vesca subsp. vesca)*

- *1-amioocyclopane-1-carboxylate oxidase homolog (Fragaria vesca subsp. vesca)*
- *DNA Jprotein homolog 1-like (Fragaria vesca subsp. vesca)*

Todos corresponden a genes del género *Fragaria*, algunos de ellos correspondientes a la diploide *F. vesca* cuyo nivel de homología con la fresa cultivada *F. ananassa* es muy elevada.

En un intento de eliminar la interferencia debida a los contaminantes de *Petunia* se sembraron posibles positivos que contenían R1 y R2 en diferentes concentraciones de 3-AT (2, 5 y 10 mM, siendo 2 mM la concentración de uso normal) para ver si añadiendo más cantidad de este compuesto se podía evitar el crecimiento debido a la presencia de los contaminantes (Figura 20). El resultado fue que las levaduras transformadas con R1 y R2 seguían creciendo con una concentración 10 mM de 3-AT, por lo que esta estrategia de selección no fue efectiva.

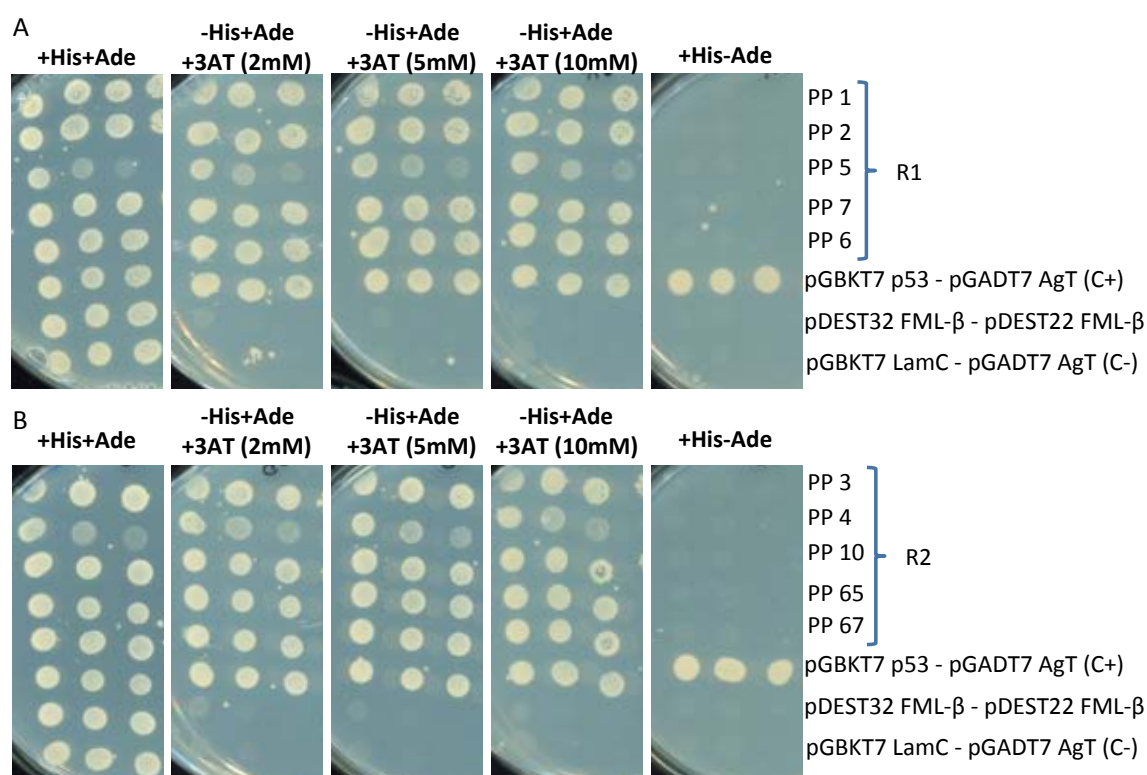


Figura 20.- Crecimiento de los posibles positivos con R1 y R2 en diferentes concentraciones de 3-AT. A) Posibles positivos con R1. B) Posibles positivos con R2. Se sembraron los posibles positivos en el medio de selección +His -Ade con concentraciones 2, 5, y 10 mM de 3AT. Las levaduras co-transformadas con FML-β eran un control positivo adicional (Posé *et al.*, 2013). Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días.

Debido a esta contaminación se empezó a trabajar con la genoteca de fruto verde. La proteína Fra a 1.01 es la más abundante en el fruto verde. Por este motivo, se empezó a buscar en la genoteca de fruto verde posibles interactores de Fra a 1.01. Después de 5 transformaciones con Fra a 1.01 y la genoteca de fruto verde se obtuvieron 28 posibles positivos que se analizaron por restricción con *KpnI* y *SacII*, y se comprobó que esa genoteca también estaba contaminada con genes de *Petunia* presentes en los positivos previamente identificados como R1 y R2. Por este motivo, se diseñaron oligonucleótidos de R1 y R2 que amplificaran *EYFP*, que es común para ambos, para comprobar la presencia de estos contaminantes en los posibles positivos directamente por PCR, sin tener que extraer DNA, ni transformar *E.coli* y ni hacer análisis de restricción. En la Figura 21 se puede ver un ejemplo de comprobación mediante PCR de la posible contaminación.

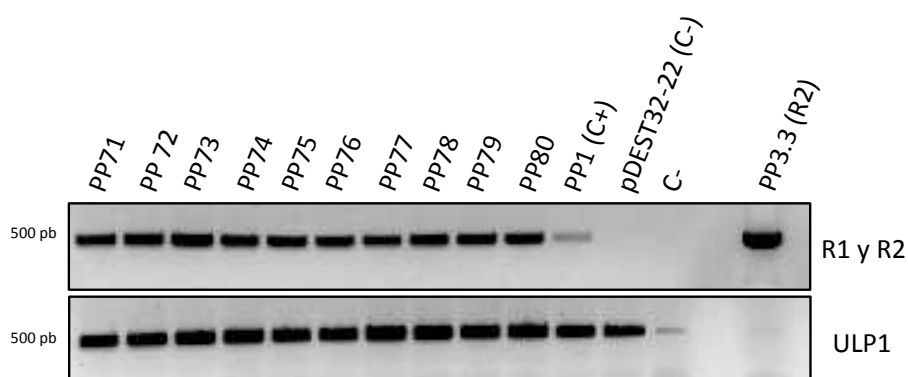


Figura 21.- Comprobación de la presencia de R1 y R2 en diferentes posibles positivos mediante PCR con oligonucleótidos diseñados para amplificar EYFP. La PCR fue hecha en paralelo con los oligonucleótidos para los contaminantes, EYFP (fragmento de 460pb) y con los de un gen constitutivo de levaduras ULP1 (fragmento de 512). Las calles del PP71 al PP80 corresponden a nuevos posibles positivos, la calle PP1 corresponde a un posible positivo del escrutinio anterior como control positivo de R1, la de *pDEST32-22* corresponde a una levadura transformada con los plásmidos *pDEST22* y *pDEST32* vacíos, la siguiente (C-) corresponde al control negativo con agua, y la última corresponde a un control positivo de DNA de uno de los plásmidos contaminantes.

Después de comprobar por PCR todos los posibles positivos solo hubo tres de ellos (PP12.1, 13.1 y 14.1) en los que no estaban presente los contaminantes. A esos tres posibles positivos se le extrajo el DNA, se transformó *E.coli* y se analizaron mediante ensayos de restricción. Dos de los positivos (13.1 y 14.1) parecían contener el mismo plásmido, pero todos tenían solo un plásmido en la levadura (Datos no mostrados). Se retransformaron levaduras con estos plásmidos junto con *Fra a 1.01*, para ver si se repetía la interacción, y con el plásmido vacío para comprobar que no estuviesen auto

activando el sistema (Figura 22). Como se puede ver en la Figura 22A, solo hubo crecimiento en uno de los posibles positivos (PP12.1). Se trataba de una interacción débil porque solo creció en el medio selectivo 3 (-His +Ade +3AT), que es el menos restrictivo, pero no creció cuando se co-transformó con el plásmido vacío, por lo que no autoactiva el sistema. Debido a esta interacción positiva, procedimos a la caracterización de este posible positivo PP12.1 (ver más adelante).

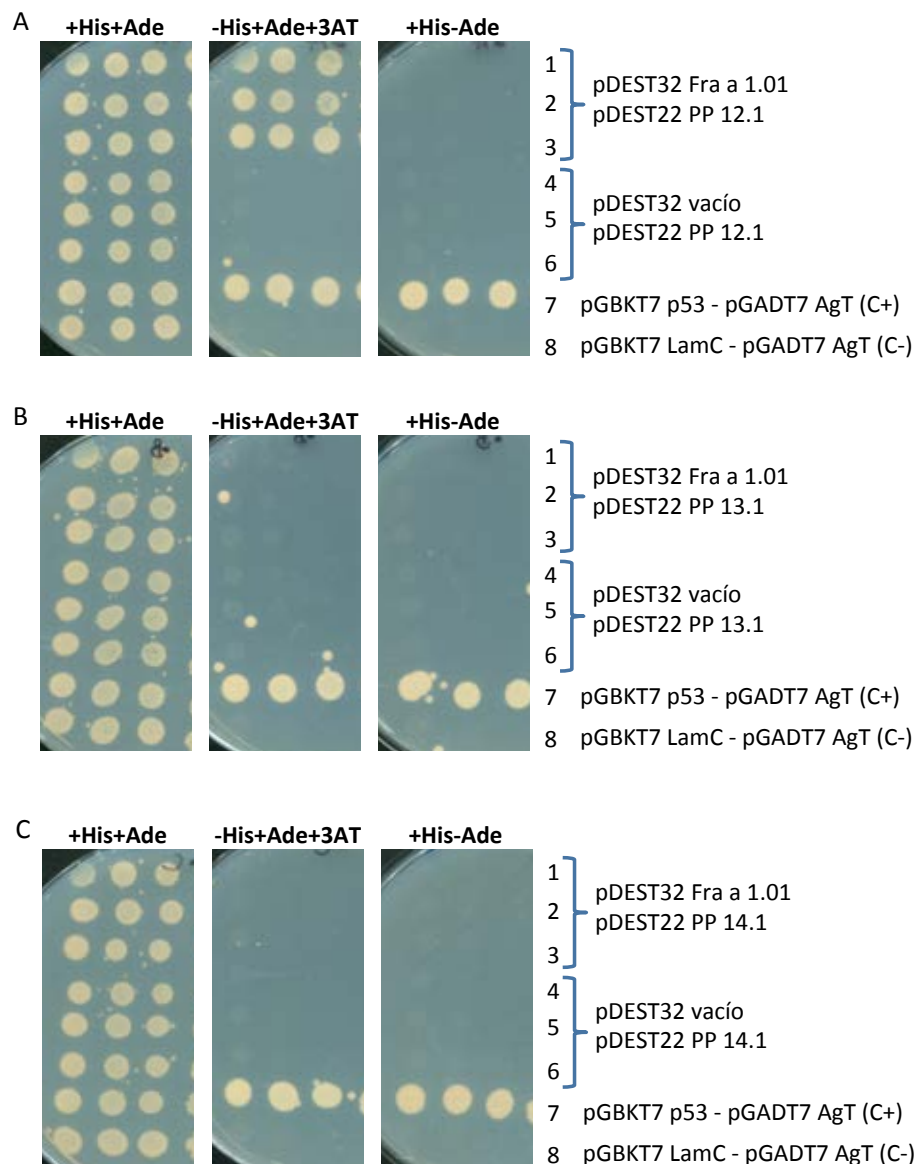


Figura 22.- Comprobación de crecimiento y autoactivación con los posibles positivos PP12.1, 13.1 y 14.1. Las levaduras co-transformadas con los vectores indicados en la parte derecha están sembradas en 3 medios diferentes de selección, que se indican en la parte superior. Co-transformaciones de Fra a 1.01 y el plásmido vacío con PP12.1 **A**), PP13.1 **B**) y PP14.1 **C**). Las placas están crecidas 5 días a 28°C y se sembraron 5 diluciones seriadas 10^{-1} , aunque están representadas las tres más concentradas.

Repetición de la búsqueda de interactores mediante doble híbrido de levaduras utilizando el sistema de Clontech

Debido a los problemas de contaminación de las genotecas y a la imposibilidad de poder detectar interacciones en presencia de estos clones contaminantes, procedimos a comprobar si nuevas alícuotas de las genotecas, así como las genotecas en *pENTR* (paso inicial a la clonación en *pDEST22*) también estaban contaminadas. Esto se hizo mediante PCR empleando los oligos para EYFP, ya que es común en ambos recombinantes y no debería estar presente en las genotecas de fresa (Figura 23). Como se puede ver en la Figura 23A ambas genotecas están también contaminadas cuando se encuentran en el vector de destino *pDEST22*, pero no cuando están en *pENTR* (Figura 23B).

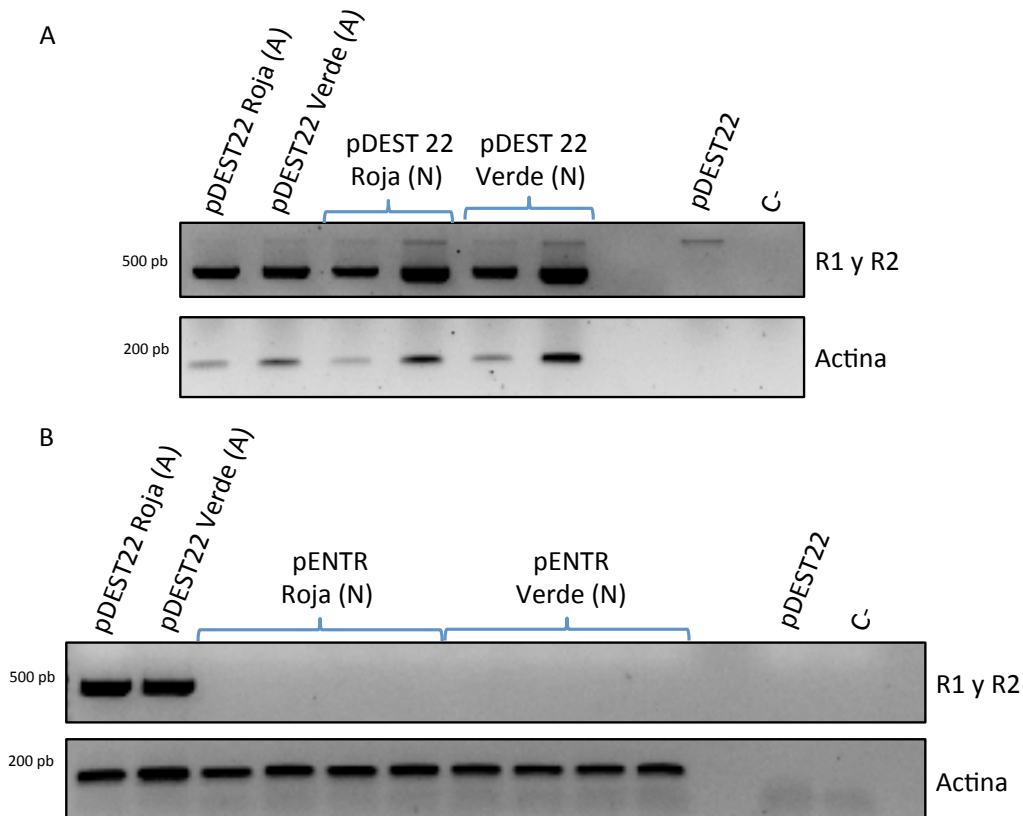


Figura 23.- Resultado de la amplificación por PCR del DNA extraído de las diferentes genotecas, utilizando oligonucleótidos frente a EYFP. A) Comprobación de diferentes diluciones de las nuevas (N) alícuotas de las genotecas en el vector final *pDEST22*, como control positivo se incluyeron una alícuota de cada genoteca antigua (A) y como controles negativos el vector vacío *pDEST22* y el control con agua. **B)** Comprobación de varias alícuotas nuevas (N) de las genotecas en *pENTR*, siendo los controles positivos y negativos los mismos que en el panel A. El tamaño de amplificación con los oligonucleótidos de R1 y R2 es de 460 pb y el de actina de 129 pb.

Debido a que había que reclonar las genotecas en un vector para doble híbrido y que se había comprobado que en pDEST32 los genes *Fra a 1* tenían un bajo nivel de expresión, se decidió cambiar al sistema de doble híbrido de Clontech, en el que ya había experiencia previa en el laboratorio. Para ello, hubo que clonar las genotecas en el vector *pGADT7* (con el AD), y los genes *Fra a 1* en *pGBKT7* (con el BD). La construcciones de *Fra a 1* utilizadas en el sistema Invitrogen no tenían un codón de STOP al terminar el gen y por esto incluían la secuencia de 14 aminoácidos procedentes del vector *pDEST32*, por lo que se le incluyó un codón de stop para que esto no pasase.

Una vez clonados los genes *Fra a 1.01*, *Fra a 1.02* y *Fra a 1.03* con codón de stop en *pGBKT7-BD* se volvieron a realizar las pruebas de toxicidad y autoactivación, así como los *western blots* para comprobar los niveles de expresión en este nuevo vector. En la Figura 24 se puede comprobar, en las mismas condiciones de *western blot* y relevado, y con la misma exposición (1200 segundos) que en la Figura 15, la presencia de las bandas de las tres *Fra a 1* fusionadas con Gal4-BD. *Fra a 1.03* se ve más tenue que en el sistema de Invitrogen, pero similar a las otras dos *Fra a 1*, presentando, por tanto, las tres proteínas *Fra a 1* una expresión más uniforme. Aun así, la expresión es considerablemente más baja que la de los controles *p53* y *LamC*.

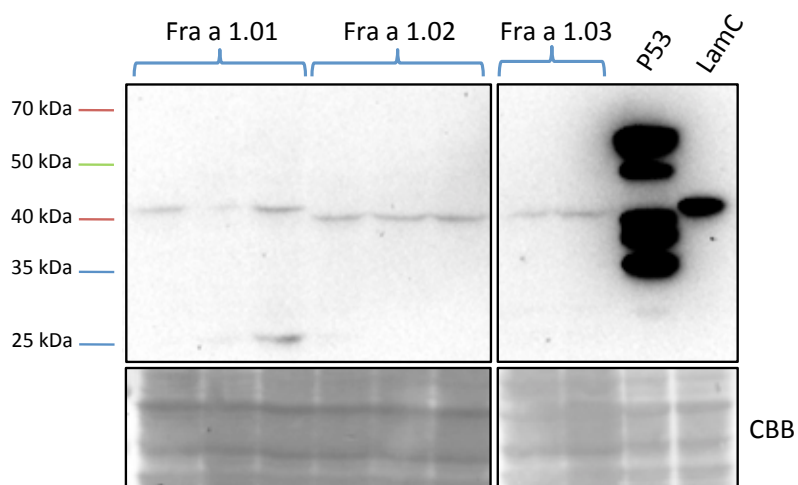


Figura 24.- Expresión de las proteínas *Fra a 1.01*, *Fra a 1.02* y *Fra a 1.03* en levaduras con el sistema Clontech. De *Fra a 1.01* y *1.02* hay tres muestras que corresponden a tres colonias diferentes de la misma cepa, mientras que *Fra a 1.03* son solo dos colonias. Las extracciones de proteínas procedían de cepas de levaduras transformadas con las distintas *Fra a 1* en el plásmido *pGBKT7* y el plásmido *pGADT7* vacío. La penúltima calle corresponde a la extracción de proteínas de una cepa de levadura transformada con *pGBKT7 p53* y *pGADT7 AgT*, mientras que la última corresponde a una cepa de levadura

transformada con *pGBKT7 LamC* y *pGADT7 AgT*, que son los controles positivo y negativo del doble híbrido, respectivamente. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. Los tamaños estimados de las proteínas de fusión son: Fra a 1.01-Gal4BD 39,4 kDa, Fra a 1.02-Gal4BD 39,1 kDa, Fra a 1.03-Gal4BD 39 kDa, p53-Gal4BD 57 kDa y LamC-Gal4BD 40 kDa. Anticuerpo anti-Gal4BD.

De forma paralela, y como mecanismo de control adicional, se realizó una prueba de diversidad de las genotecas antes de clonarlas desde *pENTR* al nuevo vector de destino. Para ello se extrajo DNA de 24 colonias aisladas y se hicieron análisis de restricción con *EcoRV* y *HpaI* (Figura 25). Los DNA que presentaban patrones de banda parecidos se secuenciaron para comprobar si se trataba de los mismos clones y, a su vez, para comprobar que eran efectivamente genotecas de fresa. Ninguna de las colonias que se mandó a secuenciar coincidía con otra, por lo que se comprobó que las 24 colonias correspondían a clones diferentes. Además, se comprobó por sus secuencias que correspondían a genes de fresa.

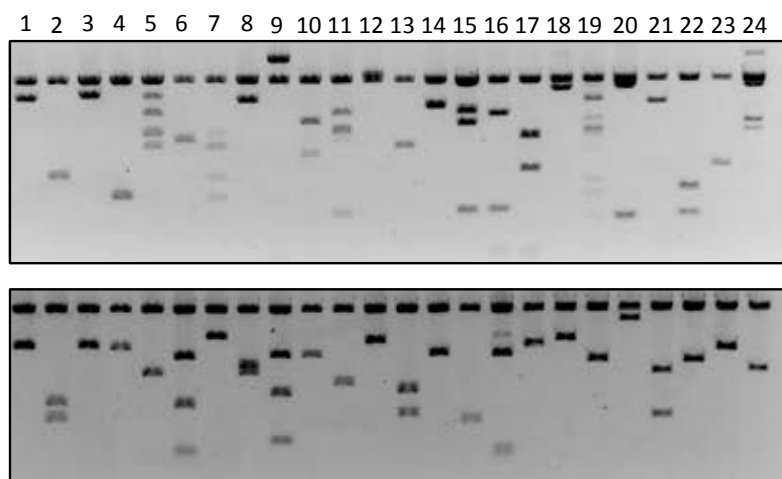


Figura 25.- Análisis de restricción de las genotecas para comprobar su diversidad. La imagen superior corresponde a 24 colonias de la genoteca de fruto rojo y la imagen inferior a otras 24 colonias de la genoteca de fruto verde.

Una vez realizado este análisis se procedió a la clonación de las genotecas en *pGADT7* mediante LR. Al finalizar, se volvió a comprobar la diversidad con 24 colonias por restricción, esta vez con *HindIII*, para ver que el proceso había ido bien (Figura 26).

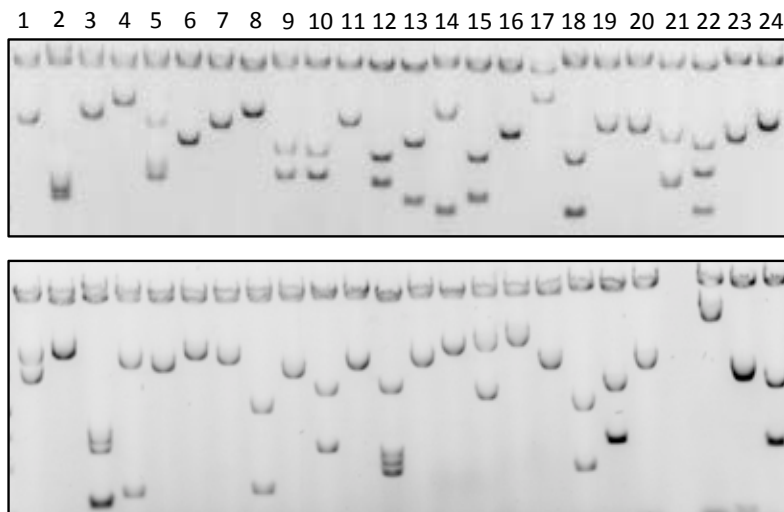


Figura 26.- Segundo análisis de restricción de las genotecas para comprobar su diversidad. La imagen superior corresponde a 24 colonias de la genoteca de fruto rojo y la imagen inferior a otras 24 colonias de la genoteca de fruto verde.

También se comprobó que las nuevas genotecas no estaban contaminadas con R1 y R2 mediante PCR con los oligonucleótidos de EYFP. Como se puede comprobar en la Figura 27, las nuevas genotecas no estaban contaminadas.

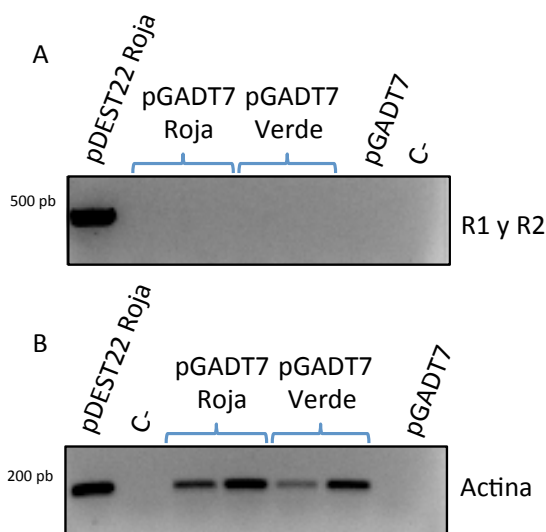


Figura 27.- Comprobación de contaminación de las genotecas en el sistema Clontech. A) PCR con los oligonucleótidos de EYFP para detectar la presencia de los recombinantes. B) PCR con oligonucleótidos de actina para comprobar la integridad del DNA. La muestra *pDEST 22* corresponde a una muestra de la genoteca antigua contaminada, usada como control positivo de la PCR de R1 y R2. Hay dos diluciones diferentes de las muestras de las nuevas genotecas en *pGADT7*. La muestra *pGADT7* corresponde al plásmido *pGADT7* vacío y la C- es el control negativo con agua.

Una vez comprobado todo lo anterior, se procedió a realizar transformaciones en las nuevas genotecas libres de contaminantes. Se hicieron varias transformaciones y el número de posibles positivos que salía en cada transformación era mucho menor. Se hicieron co-transformaciones de *Fra a 1.02* con la genoteca de fruto rojo, se escrutaron alrededor de dos millones de clones y se obtuvieron 27 posibles positivos y también de *Fra a 1.01* con la genoteca de fruto verde, donde se escrutaron alrededor de un millón de clones y se obtuvieron 35 posibles positivos (Tabla 5, Filas 4 y 5).

Tabla 5.- Resumen de las transformaciones realizadas empleando el sistema de doble híbrido de Invitrogen y de Clontech.

Nº Transformaciones	Genoteca - Fra a 1	Sistema	Eficiencia	Posibles positivos
4	Fruto rojo - Fra a 1.02	Invitrogen	$2,1 \times 10^6$	251
1	Fruto verde Fra a 1.01	Invitrogen	$7,7 \times 10^5$	28
8	Fruto rojo - Fra a 1.02	Clontech	2×10^6	27
6	Fruto verde Fra a 1.01	Clontech	$9,9 \times 10^5$	35

Todos estos posibles positivos se comprobaron siguiendo los mismos pasos descritos para el sistema de Invitrogen, sin éxito, pues algunos clones estaban auto activando el sistema, y con otros no se logró volver a reproducir la interacción cuando eran nuevamente transformados con el Fra a 1 correspondiente probando la interacción dirigida.

Caracterización del clon PP12.1 (*FaHSF3*)

Como se describió previamente (Figura 22) se encontró un posible positivo, PP12.1, en la genoteca de fruto verde que parecía interaccionar con Fra a 1.01. Para comprobar si era realmente un positivo de interacción se co-transformaron levaduras con este y con plásmidos conteniendo *Fra a 1.02* y *Fra a 1.03* para ver si interaccionaba también con las otras dos proteínas Fra a 1. Como se puede ver en las Figuras 28B y 28C PP12.2 no interaccionaba con Fra a 1.02 ni Fra a 1.03.

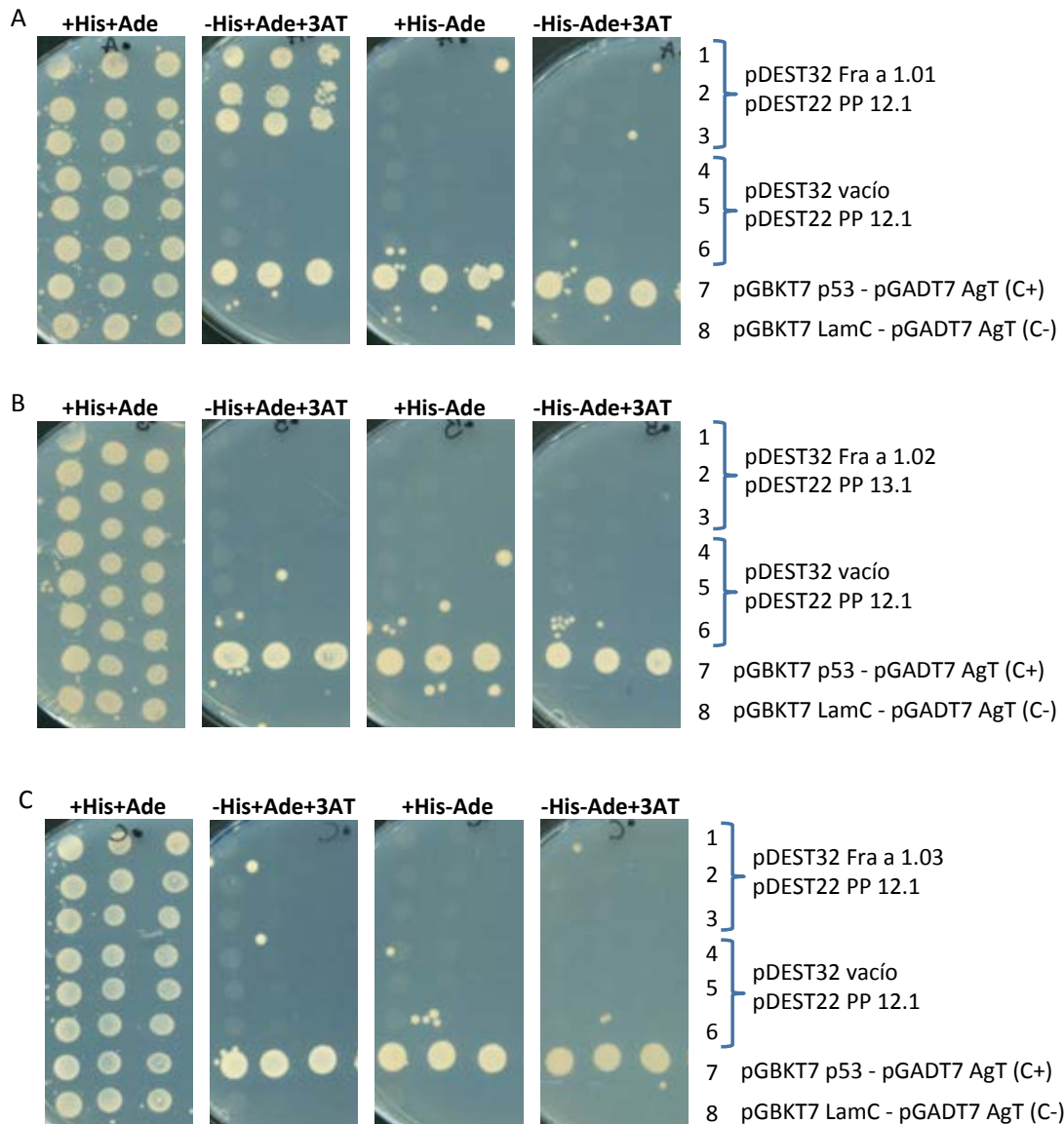
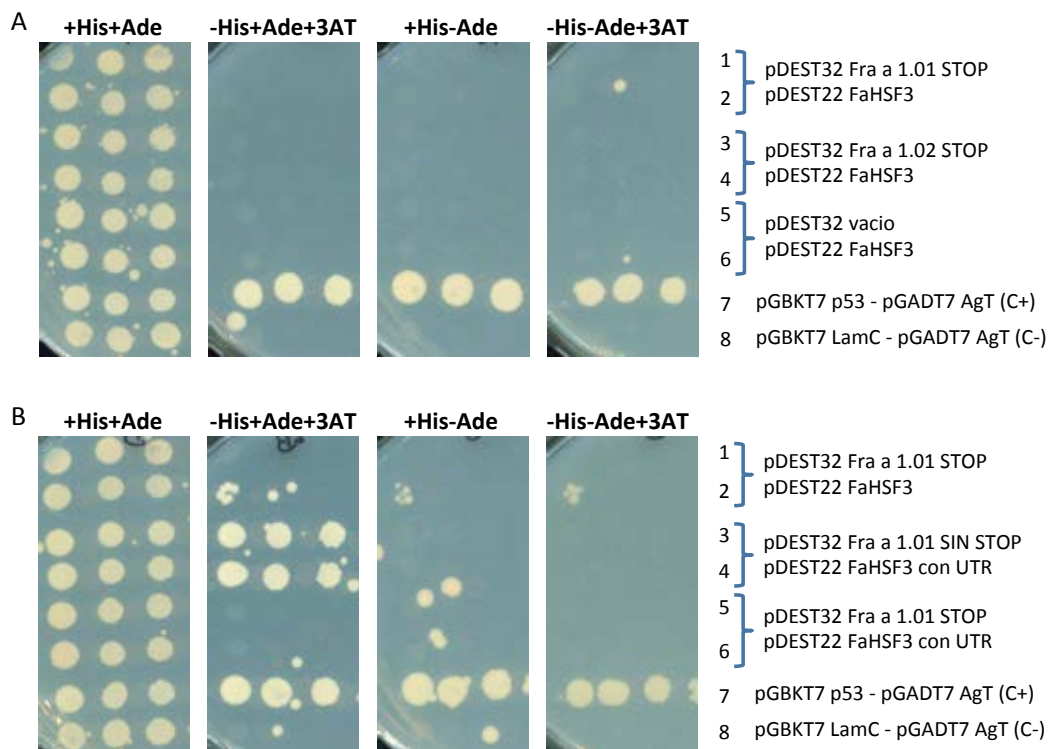


Figura 28.- Comprobación de la interacción de PP12.1 con A) Fra a 1.01, B) 1.02 y C) 1.03. Las levaduras co-transformadas fueron sembradas en 4 medios diferentes de selección. Las placas están crecidas 5 días a 28°C y se sembraron 5 diluciones seriadas 10^{-1} , aunque están representadas las tres más concentradas.

Se mandó a secuenciar el posible positivo PP12.1 y se vio que compartía un 99 % de homología con una *Heat Shock Transcription Factor Protein 3 (FaHSF3)* de *Fragaria x ananassa* cultivar Toyonoka (GenBank: KX497002).

Cuando se secuenció el clon correspondiente a PP12.1, se comprobó que el cDNA de este clon también incluye parte de las regiones 5' y 3' UTR. Para comprobar que la interacción entre *Fra a 1.01* y *FaHSF3* ocurría al emplear las regiones codificantes únicamente, se volvió a clonar *FaHSF3* (sin incluir los UTR) tanto en

pDEST22 y *pGADT7* y se repitieron las pruebas de interacción en levaduras. Empleando el sistema de Invitrogen no se logró reproducir la interacción al ponerle el codón de stop a *Fra a 1.01* y emplear solo la región codificante de *FaHsf3* (Figura 29A) mientras que si hay interacción cuando *Fra a 1.01* no tiene stop y *FaHsf3* contiene los *UTR* (Figura 29B). En el sistema de Clontech sí hubo interacción cuando *Fra a 1.01* tenía el stop y *FaHsf3* no incluía los *UTR*, pero esto no ocurría en todas las colonias (Figura 29C). Además, también interaccionaba con *Fra a 1.02* (Figura 29D) y *Fra a 1.03* (Figura 29E). Debido a lo poco concluyente de estos experimentos, se decidió realizar estudios de co-inmunoprecipitación para confirmar o desechar esta interacción.



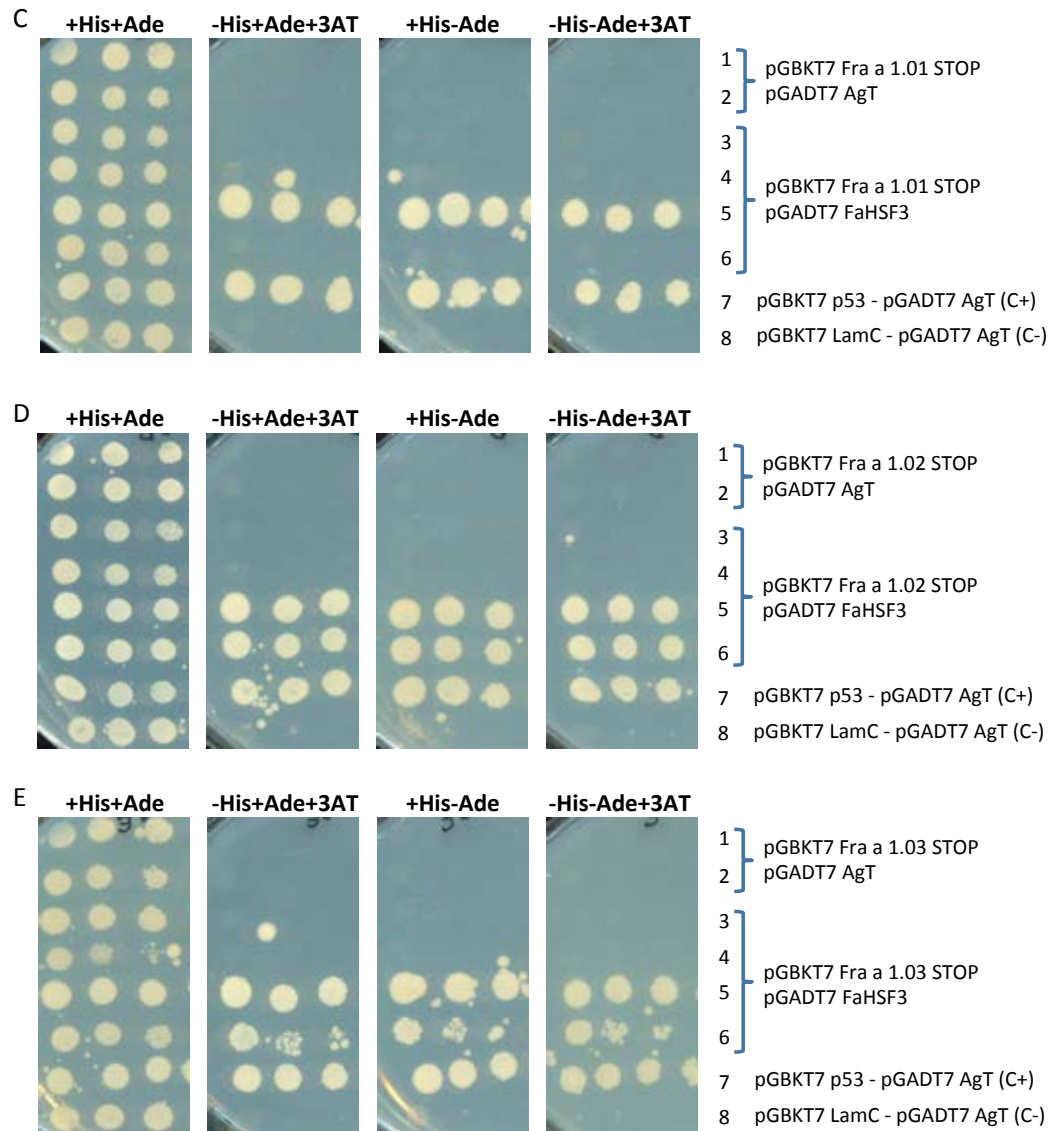


Figura 29.- Comprobación de la interacción de FaHSF3 con Fra a 1.01, 1.02 y 1.03 en los diferentes sistemas de doble híbrido y con diferentes construcciones. Los paneles A) y B) corresponden al sistema Invitrogen, mientras que los paneles C), D), F y E) al sistema de Clontech. En los casos en los que se indica STOP en alguno de los Fra a 1 significa que contienen un codón de stop al final de su secuencia y no tiene más aminoácidos, al contrario de cuando indica SIN STOP. Cuando se indica FaHSF3 con UTR significa que el vector contiene parte de sus secuencias UTR, al contrario de cuando indica sin UTR, que solo contiene la región codificante. Las levaduras co-transformadas fueron sembradas en 4 medios diferentes de selección. Las placas están crecidas 5 días a 28 °C y se sembraron 5 diluciones seriadas 10^{-1} , aunque están representadas las tres más concentradas.

- **Estudio de la interacción de Fra a 1.01 y FaHSF3 mediante co-inmumoprecipitación (CoIP)**

Para determinar de manera más fiable si había interacción entre Fra a 1.01 y FaHSF3, pasamos a realizar estudios de Co-IP en *Nicotiana benthamiana*. Para ellos, se clonaron *FaHSF3* y *Fra a 1.01* en vectores de expresión para *N. benthamiana* (pGWB6 (tag GFP) y pGWB15 (tag HA), respectivamente) y se hizo un *western blot* preliminar para comprobar que tanto FaHSF3 como Fra a 1.01 se expresaban en esta planta. El resultado fue positivo (Figura 30), por lo que se procedió a hacer la CoIP con inoculaciones en hojas de esta especie.

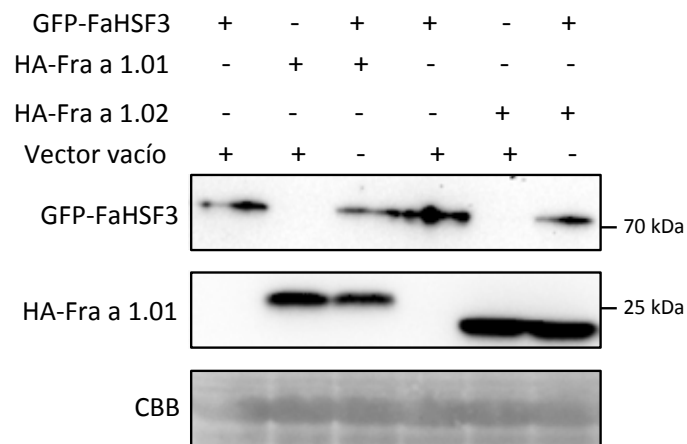


Figura 30.- Comprobación de la expresión de Fra a 1.01, Fra a 1.02 y FaHSF3 en hojas de *N. benthamiana*. El *western blot* se hizo con plantas agro-infiltradas con las diferentes combinaciones que se muestran en la parte superior de la Figura. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. El tamaño teórico de la proteína de fusión de GFP-FaHSF3 es de 78,1 kDa, de HA-Fra a 1.01 es 24,3 kDa y de HA-Fra a 1.02 es 24 kDa.

Tanto en la Co-IP de Fra a 1.01 con FaHSF3 como en la de Fra a 1.02 con FaHSF3 (Figura 31 A y B) podemos ver una banda tenue de ambas Fra a 1 en el *western blot* de CoIP anti-GFP que está revelado con anticuerpo anti-HA. La ausencia de la banda de Fra a 1 cuando no está co-expresado con FaHSF3 hace que se pueda concluir que tanto Fra a 1.01 como Fra a 1.02 se unen a FaHSF3.

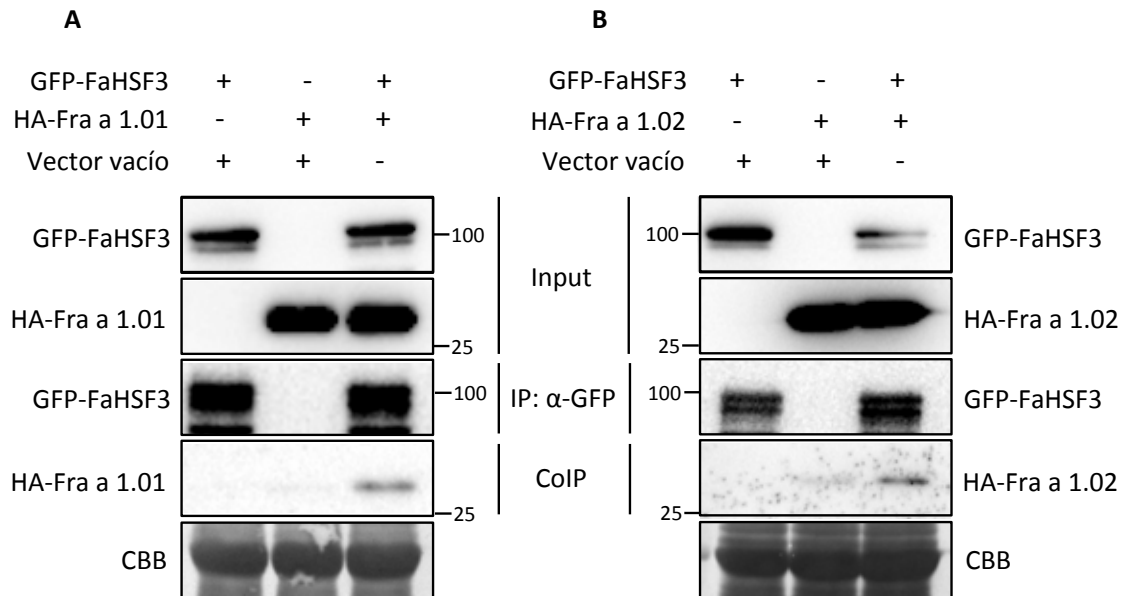


Figura 31.- Co-inmunoprecipitación de Fra a 1.01 y Fra a 1.02 con FaHSF3. A) Co-IP de Fra a 1.01 con FaHSF3. **B)** Co-IP de Fra a 1.02 con FaHSF3. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. El tamaño teórico de las proteínas de fusión GFP-FaHSF3 es de 78,1 kDa, de HA-Fra a 1.01 es 24,3 kDa y de HA-Fra a 1.02 es 24 kDa.

Posteriormente se hizo un control de la Co-IP, para comprobar que las interacciones detectadas no fuesen el resultado de interacciones inespecíficas. Por un lado se hizo una CoIP con GFP-FaHSF3 y HA-GUS (Figura 32), y por otro lado se hizo una CoIP con HA-Fra a 1.01 y GFP (Figura 33).

En el caso del control de FaHSF3 no solo se observa una banda en la Co-IP con GFP-FaHSF3 y HA-GUS, sino que también hay una banda cuando se parte solamente de HA-GUS. Parece que GUS se une a las *beads* sin necesidad de una proteína intermediaria, en cualquier caso no permite tener conclusiones sobre este control negativo.

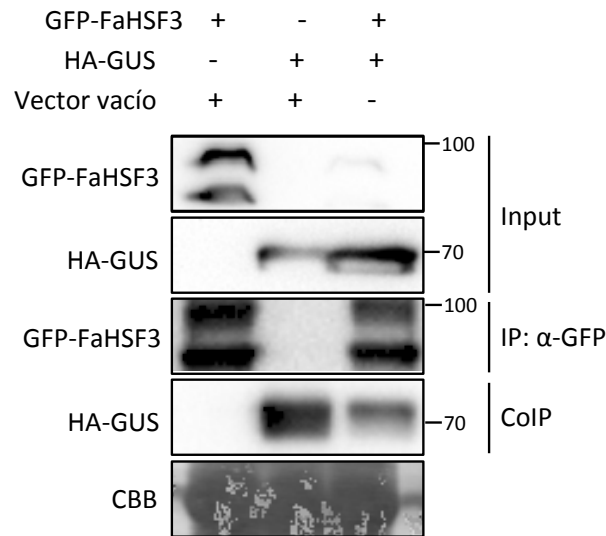


Figura 32.- Co-IP de FaHSF3 con GUS. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. El tamaño teórico de la proteína de fusión de GFP-FaHSF3 es de 78,1 kDa, de HA-GUS es 70 kDa.

Como control negativo de la interacción de Fra a 1.01 se usó la interacción Fra a 1.01 con GFP. Como se puede observar en la Figura 33, se puede detectar la presencia de HA-Fra a 1.01 en la Co-IP cuando está coinfiltrada con 35S-GFP, indicando que Fra a 1.01 puede unirse por sí misma a GFP o a las *beads*. Debido a esto, estos experimentos no fueron útiles para comprobar la posible interacción entre Fra a 1.01 y FaHSF3.

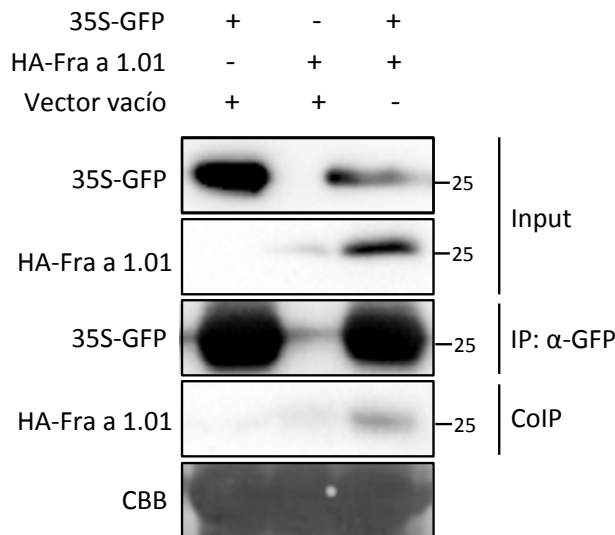


Figura 33.- Coinmunoprecipitación de Fra a 1.01 con 35S. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. El tamaño teórico de la proteína de fusión de GFP-35S es de 26,9 kDa, y de HA-Fra a 1.01 es 24,3 kDa.

- **Localización subcelular de FaHSF3 y Fra a 1**

En un intento por caracterizar la interacción empleando otras estrategias, se procedió a determinar si ambas proteínas se expresaban en los mismos tejidos y estadios de maduración de fresa así como a comprobar si compartían localización subcelular.

Para ello, y mediante PCR, se estudió la expresión de *FaHSF3* en cDNA tanto de aquenios como de receptáculos de diferentes estadios de maduración de la fresa. Como se observa en la Figura 34, se expresa en aquenio y receptáculo en todos los estados de desarrollo del fruto. De esta manera, Fra a 1.01 y FaHSF3 compartirían expresión en el receptáculo de fruto verde, haciendo que la posible interacción detectada pudiera tener sentido biológico.

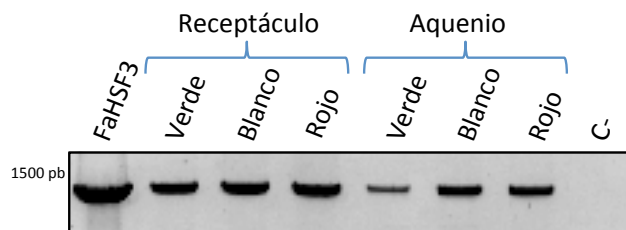


Figura 34.- Expresión de FaHSF3 mediante PCR en aquenios y receptáculos de fresa en diferentes estadios de maduración. La primera calle corresponde al DNA del plásmido de la genoteca, y la última al control negativo con agua. El tamaño de la región codificante de este gen es de 1320 pb.

Para estudiar si las dos proteínas compartían localización subcelular, se hicieron construcciones que expresaban FaHSF3, Fra a 1.01 y Fra a 1.02, fusionadas a distintos fluoróforos, *GFP-FaHSF3*, en el plásmido *pGWB6* y *RFP-Fra a 1.01* y *RFP-Fra a 1.02*, en *pH7WGR2*, y se infiltraron hojas de *N. benthamiana*. A las 48 horas post-infiltración se observaron las hojas infiltradas en un microscopio confocal LeicaTCS SP5 II (Figuras 35 y 36).

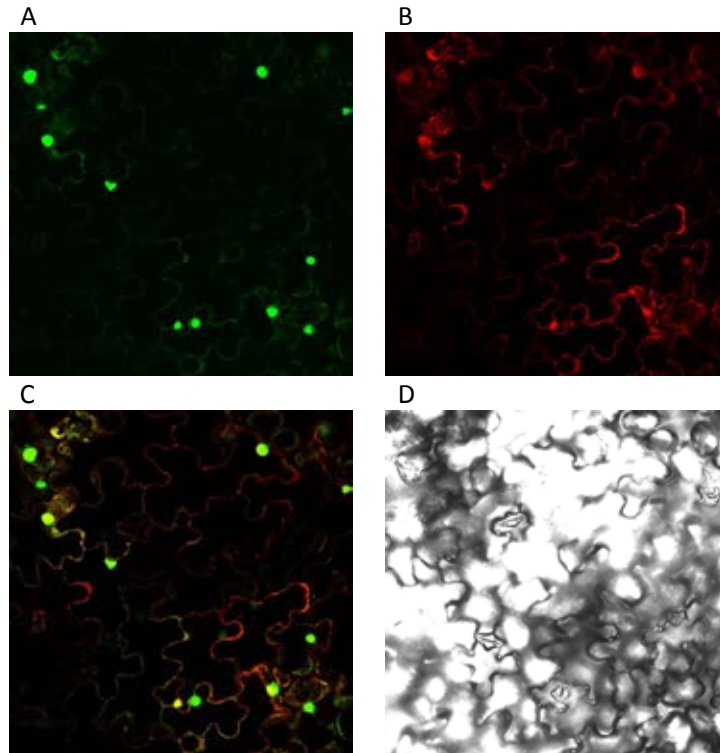


Figura 35.- Microscopia confocal de plantas *N. benthamiana* agro-infiltradas con *GFP-FaHSF3* y *RFP-Fra a 1.01*. Localización de **A)** FaHSF3, **B)** Fra a 1.01, y **C)** superposición de ambos. **D)** la misma imagen con luz visible. Las imágenes se obtuvieron con el software LAS AF Lite de Leica. Para la imagen C de co-localización se utilizó el software ImageJ.

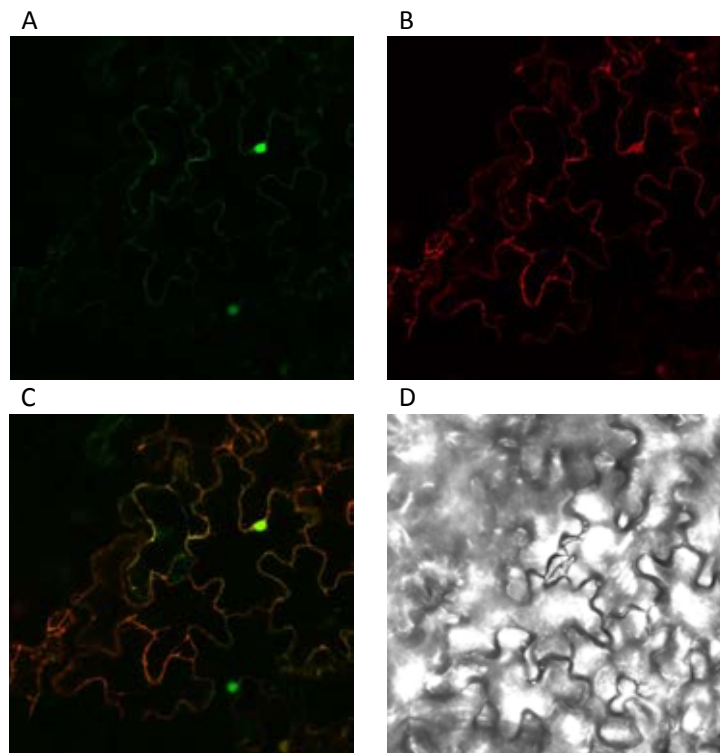


Figura 36.- Microscopia confocal de plantas *N. benthamiana* agroinfiltradas con GFP-FaHSF3 y RFP-Fra a 1.02. Localización de **A)** FaHSF3, **B)** Fra a 1.02, y **C)** superposición de ambos. **D)** la misma imagen con luz visible. Las imágenes se obtuvieron con el software LAS AF Lite de Leica. Para la imagen C de co-localización se utilizó el software ImageJ.

Se puede observar que tanto Fra a 1.01 y Fra a 1.02 se encuentran en los mismos compartimentos celulares que FaHSF3, que son núcleo y citoplasma y/o membrana. Estos resultados permiten considerar que Fra a 1 y FaHSF3 pudieran interactuar in vivo, pero serían necesarios nuevos experimentos que permitan determinar si se trata de una interacción real.

Búsqueda de la proteína interactora mediante co-inmunoprecipitación no dirigida

Con la ausencia de resultados interacción por la técnica del doble híbrido se barajaron otras alternativas para conseguir encontrar la posible proteína interactora de Fra a 1. Una de esas técnicas fue la Co-IP no dirigida que requiere el uso de una cromatografía líquida de inmunoafinidad, seguida de una espectroscopia de masas para separar e identificar los interactores (Smits & Vermeulen, 2016). Para ello se diseñaron dos estrategias, una indirecta empleando directamente la proteína Fra a 1.02 endógena en fresa y los anticuerpos policlonales anti-Fra a 1.02. En este caso, el extracto crudo se incubaría con el anticuerpo anti-Fra a 1.02 y luego se pasaría por una resina anti-IgG. Esta IgG uniría el anticuerpo anti-Fra, que tendría unido el complejo Fra a 1.02-proteína interactora. La otra estrategia emplearía la resina anti-GFP. Para ello, se generarían plantas transgénicas que expresaran Fra a 1.02 fusionada a GFP. Al incubar el extracto crudo de estas plantas con la resina anti-GFP, se uniría a esta resina el complejo Fra a 1.02-GFP-proteína interactora (Figura 37). La identificación posterior de las proteínas interactoras se realizaría mediante cromatografía líquida de inmunoafinidad, seguida de una espectroscopia de masas para separar e identificar los interactores (Trinkle-Mulcahy, *et al.*, 2008, Smits & Vermeulen, 2016).

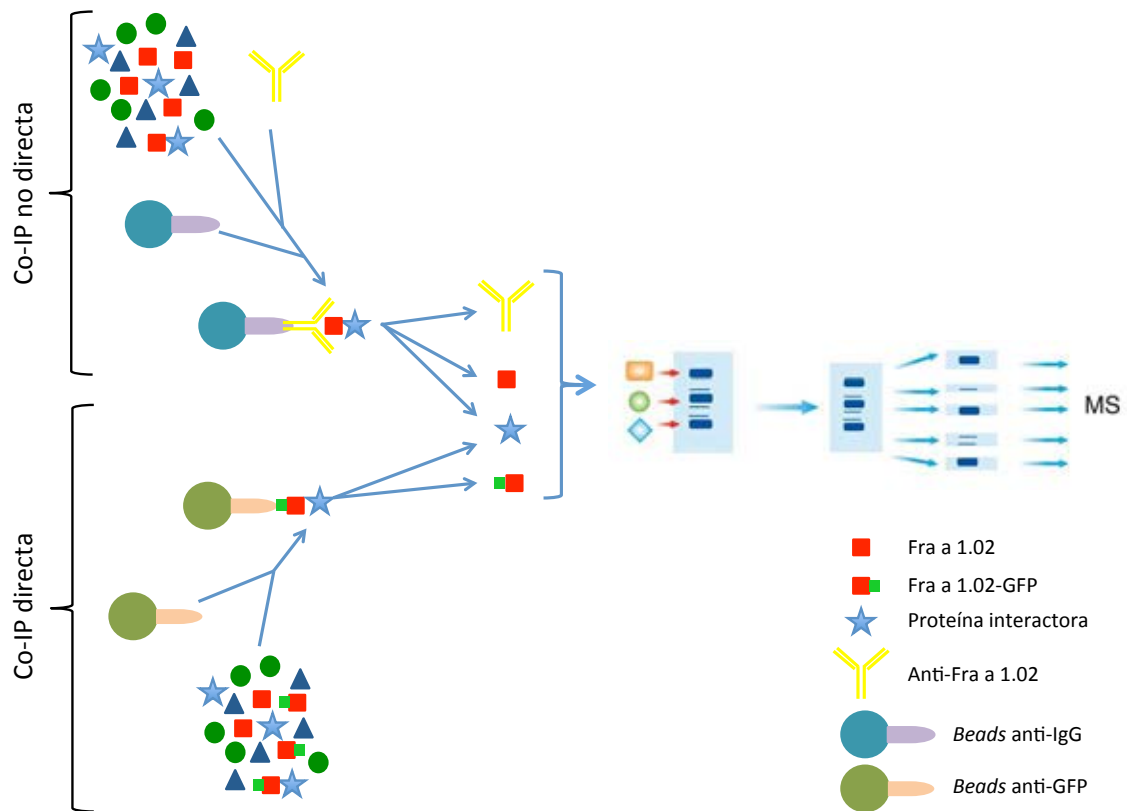


Figura 37.- Esquema del diseño de los tipos de co-inmunoprecipitaciones realizadas. En la Co-IP no directa se parte de un extracto de fresa que se incuba con anti-Fra a 1.02 y una resina anti-IgG, así se conseguiría recuperar de la resina el anticuerpo anti-Fra a 1.02, la proteína Fra a 1.02 y su interactor. Mientras que en la Co-IP directa se parte de un extracto de proteínas de fresas transgénicas que contienen Fra a 1.02 fusionado a GFP, que se unen directamente a la resina anti-GFP, y se conseguiría recuperar de la resina el Fra a 1.02-GFP y su interactor.

- **Co-inmunoprecipitación indirecta**

Se comenzó con esta estrategia ya que era más inmediato obtener extracto proteico del fruto silvestre. Para ello se incubó un extracto de proteínas de fresa con el anticuerpo anti-Fra a 1.02 y con una resina anti-IgG, con el fin de fijar en la resina las proteínas Fra a 1 unidas a los posibles interactores.

Con la intención de emplear extractos de fresa que contuviesen la mayor cantidad posible de proteínas Fra a 1, intentamos determinar en qué parte del fruto es mayor la expresión de éstas. Ya se sabía, por comunicación personal con el Dr. David Posé, que los genes *Fra a 1* muestran un patrón de expresión diferente en distintos tipos celulares del fruto, siendo especialmente abundantes en la epidermis en *F. vesca*. Por este motivo, se analizó por *western blot* la cantidad de las Fra a 1 en diferentes partes

del fruto, para identificar la más enriquecida en estas proteínas, y consiguientemente buscar la posible proteína interactora empleando extractos de este tejido. La Figura 38 muestra que hay una mayor cantidad de Fra a 1 en extractos enriquecidos de epidermis, confirmando los análisis de expresión. Por este motivo, se intentó realizar las Co-IP en extractos enriquecidos en epidermis.

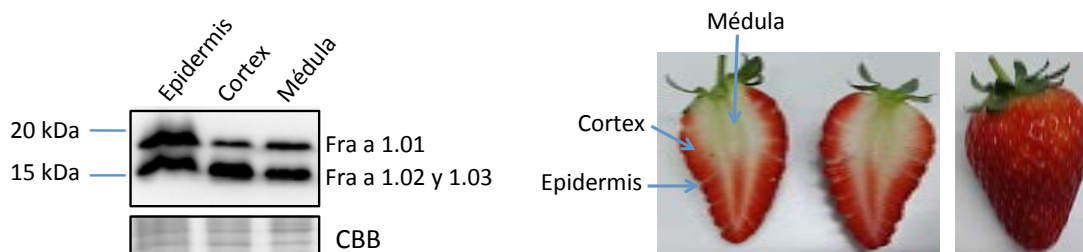


Figura 38.- Western blot en los diferentes tejidos de fruto rojo. Se muestra la cantidad de Fra a 1 que hay en los diferentes tejidos. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*. El panel de la derecha muestra en corte longitudinal de fresa los tejidos empleados para hacer los extractos de proteínas.

Al analizar los extractos obtenidos de la Co-IP no dirigida (Figura 39) se observó que había cantidad suficiente de Fra a 1 en el extracto inicial, antes de la incubación del extracto con el anticuerpo anti-Fra a 1 y las *beads* anti-IgG (calle 1). El sobrenadante de dicha incubación (calle 3) también mostró una cantidad apreciable de Fra a 1. Sin embargo, no se recuperó nada de Fra a 1 después de hacer los lavados de las *beads* (calle 2). Por lo que se concluyó que bien el anticuerpo anti-Fra a 1 no se une a las *beads* anti-IgG o la unión de Fra a 1 con su anticuerpo es muy débil y se separaron con los lavados.

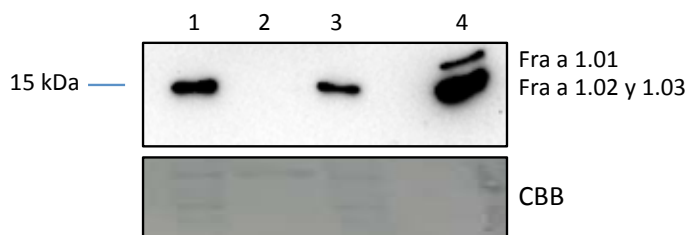


Figura 39.- Inmunoprecipitación no dirigida de Fra a 1 con extracto de proteínas de fruto rojo. Se muestra el *western blot* con anticuerpo anti-Fra a 1.02 de los diferentes extractos y fracciones. La calle 1 corresponde al extracto de proteínas inicial, la 2 al producto final, después de haber sido separado de las *beads*, la 3 al sobrenadante de la incubación con el anticuerpo y las *beads*, y la 4 a un control positivo de extracción de proteínas. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

- **Co-inmunoprecipitación directa**

Debido a la dificultad de unión de el anti-Fra a 1.02 a la resina en la inmunoprecipitación indirecta se pensó que sería más directo si las Fra a 1 se uniesen directamente a la resina, en este caso anti-GFP (Smits & Vermeulen, 2016), por lo que se diseñaron plantas transgénicas de *F. x ananassa* cv. Camarosa que sobreexpresasen Fra a 1.01 y Fra a 1.02 fusionadas a GFP empleando el vector *pGWB5*, para así también aumentar la cantidad de Fra a 1 en la planta. Finalmente se generaron 9 líneas transgénicas independientes de sobreexpresión de Fra a 1.01 bajo el promotor *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor (*35S::Fra a 1.01GFP*), otras 7 líneas de sobreexpresión de Fra a 1.02 (*35S::Fra a 1.02GFP*) y 4 líneas control transformadas con el plásmido vacío *pGWB5*.

Se realizó un ensayo *western blot* para comprobar la presencia de la proteína de fusión Fra a 1-GFP (tamaño teórico 46,5 kDa) (Figura 40). Aunque se esperaba una gran expresión de esta proteína, solo se observó expresión en algunas de las líneas de sobreexpresión y en una cantidad muy pequeña con respecto a las Fra a 1 endógenas. Se hizo el ensayo tanto con un anticuerpo anti-Fra a 1.02, con diferentes tiempos de exposición en el revelado de las bandas, que reconoce Fra a 1.01, 1.02 y 1.03, como con un anticuerpo anti-GFP. La proteína de fusión (46,5 kDa) solo se identificaba claramente, con el anticuerpo anti-Fra, en las líneas *35S::Fra a 1.01GFP* (L4) y *35S::Fra a 1.02GFP* (L3), y en una cantidad muy inferior a las proteínas Fra a 1 endógenas (17,5 – 18 kDa). Sin embargo, solo en la línea de sobreexpresión *35S::Fra a 1.01GFP* (L4) se identificaba, de forma nítida, una banda con el anticuerpo anti-GFP.

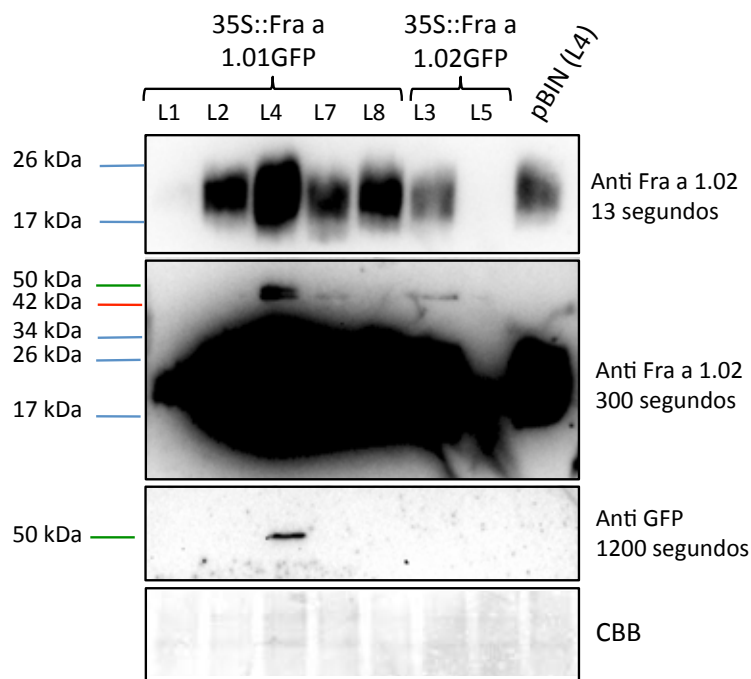


Figura 40.- Visualización de proteínas de las líneas de sobreexpresión transgénicas en frutos. Los tres revelados se hicieron con el kit de revelado sensible. El primer panel de anti Fra a 1.02 se expuso 13 segundos, el segundo de anti Fra a 1.02 se expuso 300 segundos y el de anti GFP 1.200 segundos, los tres tienen la misma cantidad de proteína cargada. pBIN (L4) actúa como control negativo en este caso. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

También se realizó un análisis proteico en las raíces (de plántulas de una semana en tierra) y las hojas para ver cómo era la expresión de las proteínas de fusión en los diferentes tejidos. En hojas no hubo expresión de la proteína de fusión (resultados no mostrados) mientras que en raíces si se vio la expresión de la proteína de fusión en algunas líneas (Figura 41). Al incubar la membrana con el anticuerpo anti-GFP se puede observar la proteína de fusión en las líneas *35S::Fra a 1.01GFP* (L1, L2, L4 y L8) y *35S::Fra a 1.02GFP* (L3 y L7), mientras que al incubarla con el anticuerpo anti-Fra a 1.02 se observa la proteína de fusión en las líneas *35S::Fra a 1.02GFP* (L3 y L8). En ambos casos ocurre como en fruto, que la banda de la proteína de fusión es mucho menor que la de las proteínas Fra a 1 endógenas.

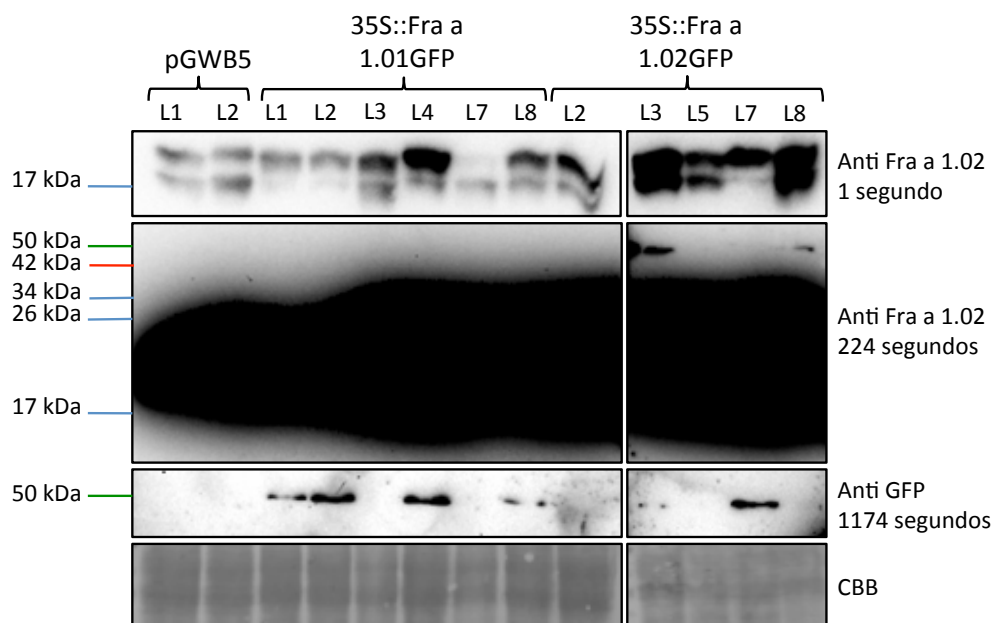


Figura 41.- Visualización de proteínas de las líneas de sobreexpresión transgénicas en raíces. Con las mismas muestras se hicieron dos *western blots*, uno con anticuerpo anti-GFP y otro con anticuerpo anti-Fra a 1.02. Los revelados se hicieron con el kit de revelado sensible, el primer panel de anti-Fra a 1.02 se expuso 1 segundo, el segundo panel de anti-Fra a 1.02 se expuso 224 segundos mientras que el de anti-GFP 1179 segundos, los tres tienen la misma cantidad de proteína cargada. Las muestras pGWB5 (L1 y 2) actúan como control negativo de la proteína de fusión. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

Finalmente, debido a la débil expresión de las proteínas de fusión encontrada en el global de todas las líneas de sobreexpresión, estas líneas transgénicas no se pudieron emplear para la inmunoprecipitación, dado que se requiere de una cantidad de proteína Fra a 1.02GFP que no se puede conseguir en esas líneas.

Discusión

El fundamento por el que realizamos la búsqueda de una posible proteína interactora de Fra a 1 fue la hipótesis de que la acción molecular de las proteínas Fra a 1 fuera similar a la del receptor de ABA, que presenta una alta homología estructural con las proteínas Fra a 1 (Casañal *et al.*, 2013a). En el receptor de ABA, su acción molecular y su respuesta funcional están mediadas por la unión de un ligando, el ABA, y una proteína interactora, PP2C (Melcher *et al.*, 2009). Esta unión desencadena la cascada de señalización que es clave para entender la funcionalidad de los componentes del complejo. En el caso de las proteínas Fra a 1 se han identificado previamente

posibles ligandos presentes en el fruto de fresa (Casañal *et al.*, 2013a). La posible identificación de una proteína interactora daría información relevante sobre la función desconocida de las proteínas Fra a 1 en el fruto de fresa, además de sobre su modo de actuación molecular. Finalmente, no se ha encontrado ninguna proteína interactora en esta búsqueda, lo que no quiere decir que no exista, pero con las técnicas usadas no se ha logrado. Existen una variedad de técnicas que podrían utilizarse y que están basadas en distintos principios físico-químicos y/o modelos predictivos (Lalonde *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019).

En la búsqueda de interactores mediante el doble híbrido, el proceso de descubrir que las genotecas estaban contaminadas con dos genes de *Petunia*, la comprobación de todos los falsos positivos y la posterior clonación de una nueva genoteca, libre de contaminantes en los plásmidos de destino, significó un gran periodo de tiempo no previsto inicialmente para este experimento. Aún así, al final se consiguió escrutar el número suficiente de clones de cada genoteca como para asumir que se han escrutado todos los posibles genes clonados a pesar de que, al ser una genoteca de cDNA, algunos genes están más representados que otros.

Sin embargo, hubo un posible positivo cuando se utilizó Fra a 1.01 y la genoteca de frutos verdes, que dio una primera interacción positiva. Después de las comprobaciones, se vio que contenía un clon que incluía la secuencia codificante de *FaHSF3*, además de parte de su región 5'-UTR y 3'-UTR. Pero al repetir el experimento únicamente con la región codificante de *FaHSF3* no se volvió a restablecer la interacción por doble híbrido. No tenemos una explicación concreta para este reconocimiento cuando el clon de cDNA incluía las regiones UTR, pero sí se indica en los protocolos que este control sin la región UTR debe hacerse (Lin & Lai, 2017), por lo que sí debe haberse detectado en experimentos anteriores como una fuente de falsos positivos. Sin embargo, al repetir el experimento con *FaHSF3* y Fra a 1.01 en el sistema Clontech, sí hubo una interacción positiva, en algunas colonias, aún después de eliminar las regiones UTR. Al no ser un resultado sólido, ya que solo ocurría la interacción en algunas colonias se decidió que se comprobaría por co-inmunoprecipitación dirigida en *N. benthamiana*.

En esta Co-IP los resultados tampoco fueron concluyentes porque aunque se identificó una banda de Fra a 1.01 al revelar con anticuerpo anti-HA donde se esperaba, esa misma banda salió cuando la co-expresión se hizo con Fra a 1.01 y con GFP sin fusionar a otra proteína. El problema, al final, fue el no encontrar un control negativo para la interacción de Fra a 1.01. Paralelamente se comprobó la localización celular de FaHSF3 y Fra a 1.01 gracias a la fusión de FaHSF3 a GFP y Fra a 1.01 a RFP y ambas se localizaban en núcleo, citoplasma y/o membrana. Sin embargo, al no tener resultados netamente positivos de interacción por doble híbrido o por co-inmunoprecipitación, este resultado de la co-localización no tiene valor intrínseco, al tratarse solo de una condición necesaria. Es interesante que, en fresa, se han identificado algunos miembros de esta familia de TFs que están implicados en la respuesta a un estrés abiótico como la termotolerancia (Liao *et al.*, 2016). Debido a que las proteínas Fra a 1 estén clasificadas como proteínas PR10, podría pensarse que de alguna forma pueden estar implicadas en las respuestas a estrés.

A pesar de no haber podido comprobar de forma repetitiva que FaHSF3 interacciona con Fra a 1.01, tampoco se ha podido que dicha interacción exista, ya que los resultados no han sido concluyentes ni mediante doble híbrido ni mediante Co-IP. Por lo que antes de descartar la posible interacción de FaHSF3 con Fra a 1.01, habría que estudiar qué está ocurriendo en el doble híbrido, mediante la realización de nuevos experimentos con todas las posibles combinaciones (Fra a 1.01 con y sin STOP, FaHSF3 con y sin UTR, y sistema de Clontech e Invitrogen) y con suficientes repeticiones. Por otro lado, en cuanto a la Co-IP habría que buscar buenos controles negativos que no interaccionen ni con Fra a 1.01 ni con FaHSF3 para poder repetir la Co-IP y determinar si hay interacción.

Una de las posibles alternativas en la búsqueda de interactores para las proteínas Fra a 1 sería realizar los ensayos en presencia de un posible ligando natural de alguna de las proteínas. Esto ha tenido éxito en el caso del receptor del ABA, estructuralmente parecido a las proteínas Fra a 1. La unión entre el receptor y su proteína interactora (PP2c) para formar un complejo se ha demostrado que es facilitada en presencia de ABA (Santiago *et al.*, 2009). En el caso de las proteínas Fra a 1 se han identificado compuestos del tipo flavonoides (quercetina-3-O-glucuronido, miricetina y (+)-catequina) que se unen *in vitro*, en un rango μM , a Fra a 1.01, Fra a 1.02 y Fra a 1.03

(Casañal *et al.*, 2013a). Esta posibilidad puede contemplarse, teniendo como limitaciones la disponibilidad y coste del ligando.

Con la ausencia de resultados por la técnica del doble híbrido se barajaron otras alternativas para conseguir encontrar la posible proteína interactora de Fra a 1. Una de esas técnicas fue la co-inmunoprecipitación no dirigida, tanto directa como indirecta.

El resultado de la co-inmunoprecipitación no directa con Fra a 1.02 fue que después de los lavados de la columna con la resina no se detectaba la presencia de Fra a 1.02. De alguna forma, las interacciones esperadas IgG/anti-Fra a 1.02, o Fra a 1.02/anti-Fra a 1.02 no se dieron. Para mejorar la unión con la resina, se podrían probar diferentes rangos de concentraciones tanto de los extractos como de los tampones y la astringencia de este, ya que puede existir una amplia variabilidad en la afinidad de las interacciones que se buscan.

En cuanto a la co-inmunoprecipitación directa, que era un diseño más directo, ya que no necesita de un anticuerpo intermedio, sino que la GFP fusionada con Fra a 1 se une directamente a la resina, el problema fue que las líneas de sobreexpresión no produjeron la proteína de fusión, algo que se detectó por *western blot*, o las produjeron en tan baja cantidad que hacía inviable la realización de los experimentos. Desconocemos los motivos por los que no se logró la sobreexpresión de Fra a 1 cuando la proteína está unida a GFP, quizás pudiera haber sido un sistema de regulación postraduccional por parte de la planta. Resultados similares se han obtenido en nuestro laboratorio con diferentes proteínas fusionadas a GFP expresadas en los frutos de fresa.

Después de todos estos intentos de búsqueda de la proteína interactora de Fra a 1 no hubo resultados positivos definitivos. El análisis por doble híbrido, tal como se ha hecho, queda agotado después de haber probado más de 1 millón de clones con la genoteca de fruto verde y más de dos millones con la de fruto rojo después de haber eliminado los contaminantes. Sin embargo, habida cuenta de la variedad de técnicas disponibles, algunas se han indicado, y que en principio la hipótesis de partida no está descartada, el proyecto merece hacer alguna inversión futura. Se podría probar con el sistema de la ubiquitina dividida, que se realiza también en levaduras, o con otras técnicas que no se realicen en estas, como la complementación de la luciferasa dividida

o transferencia de energía de resonancia Föster (FRET) (Lalonde *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019), ya que teniendo ambas genotecas clonadas en pENTR se podrían clonar fácilmente en los vectores de destino de estas técnicas. Incluso también podrían probarse la predicción de interacciones basadas en estructura, aunque puede que la proteína interactora de Fra a 1 no tenga una estructura predicha y por lo tanto no se encuentre nada.

Recientemente, se ha mostrado la interacción de Fra a 1.01, Fra a 1.02 y Fra a 1.03 con la proteína FaAP (Fra a 1-Associated Protein) con una constante de disociación en el rango nM (Franz-Oberdorf *et al.*, 2017). La expresión de *FaAP* se ha detectado tanto en hojas y raíces como en frutos, y en éstos su expresión aumenta con la maduración en aquenio y receptáculo (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). Esta interacción no se pudo mostrar por doble híbrido, sino que se hizo por medio de un sistema indirecto de cambio de orientación DNA de doble hebra medida por la transferencia de energía de fluorescencia en tiempo resuelto. Sin embargo, no hay una función conocida de la proteína FaAP, por lo que no se puede deducir nada en relación a la acción molecular y la función de las proteínas Fra a 1. Además, al haberse usado una técnica indirecta, con pocas referencias en la bibliografía, debería ser confirmada por alguna de las otras técnicas disponibles para conocer las interacciones proteína-proteína.

Capítulo 4: Cambios producidos por el silenciamiento de *Fra a 1.02* en frutos

Con el fin de conocer la función de la proteína *Fra a 1.02* se generaron plantas transgénicas que silenciasen *Fra a 1.02* para llevar a cabo, con sus frutos, estudios de metabolómica y de transcriptómica que pudieran dar información sobre la función de *Fra a 1.02*.

Los estudios metabolómicos permiten conocer la cantidad de metabolitos que se encuentran en las células en un momento determinado, lo que puede tener un valor funcional importante. En los frutos de fresa, donde los contenidos relativos de metabolitos muestran grandes cambios en el proceso de maduración (Fait *et al.*, 2008), los estudios metabólicos pueden ser de mucha información en relación al propio proceso de maduración (Vallarino *et al.*, 2015; Vallarino *et al.*, 2019).

El análisis del transcriptoma mediante el RNA-seq proporciona información acerca de los genes que se están transcribiendo en el momento en el que se recoge la muestra a analizar. Tiene la ventaja de sobrepasar la información reduccionista para ofrecer una visión sistémica de la actividad transcripcional en la células, tejidos, órganos u organismo de estudio. Si la especie en estudio tiene el genoma secuenciado, o al menos existe un modelo de genoma ya secuenciado para dicha especie, este análisis constituye una herramienta de interés. En el caso de la fresa cultivada, la octoploide *F. x ananassa*, existe una versión reciente, aunque aún limitada, de su genoma (Edger *et al.*, 2019), pero se puede utilizar como modelo el genoma de la especie silvestre diploide *F. vesca*, cuya versión más completa y mejor anotada (v4.0.a1) (Edger *et al.*, 2017) es la utilizada en el presente estudio. Existe una versión más reciente del genoma de *F. vesca* (v4.0.a2) (Li *et al.*, 2019) que solo está pre-anotada en algunos de sus genes.

Caracterización de las plantas transgénicas

Se generaron plantas transgénicas de fresa que silenciasen *Fra a 1.02* mediante la estrategia de RNAi. Y se emplearon construcciones que expresaran el *hairpin* para el silenciamiento bajo el control de dos promotores diferentes. Unas expresaron el *hairpin*

bajo el control del promotor *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor que se expresa en todos los tejidos de la planta de fresa, y otras lo hicieron bajo el control promotor del gen de *Expansina2* (*EXP2*, *FvH4_7g25860*). *EXP2* se expresa específicamente en fruto y su expresión aumenta conforme avanza la maduración de este, alcanzando el máximo en el estadio intermedio (Dotto *et al.*, 2006; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017), al igual que *Fra a 1.02*. Se escogió este promotor debido a que *Fra a 1.02* también presenta una alta expresión en raíces (Casañal, 2014). En el caso de que esta alta expresión en raíces desempeñara una función importante en la planta, las plantas que expresaran la construcción de silenciamiento bajo el control del promotor *CaMV35S* podrían haberse visto seriamente afectadas. El silenciamiento específico en frutos empleando el promotor de *EXP2* evitaba esta situación de haberse producido.

El objetivo de este trabajo era silenciar específicamente *Fra a 1.02*, por lo que se realizó un alineamiento de los ocho genes *Fra a 1* identificados en *F. x ananassa* para seleccionar la región con menor identidad de secuencia entre los distintos parálogos (Figura 42). Debido a que no pudimos anotar con confianza las regiones UTR para cada uno de estos genes, no pudimos diseñar la región para el silenciamiento en estas secuencias, que seguramente presentarían mayor divergencia que las regiones codificantes. Se identificó el fragmento de DNA de *Fra a 1.02*, de 124 pb, con la siguiente secuencia (5' GAAGGAGACGGAGGCGTAGGCACCATCAAGAAGATCACCTTTGGCGAAGG CAGCCAGTTCGGCTCAGTGACCCACAAGATCGATGGGATTGACAAAGAGAA CTTTGTGTACAGCTACAGTTTGG 3') como el más específico posible para este gen con respecto al resto de las *Fra a 1*, teniendo en cuenta la similitud de secuencias que tienen estos genes (Figura 42).

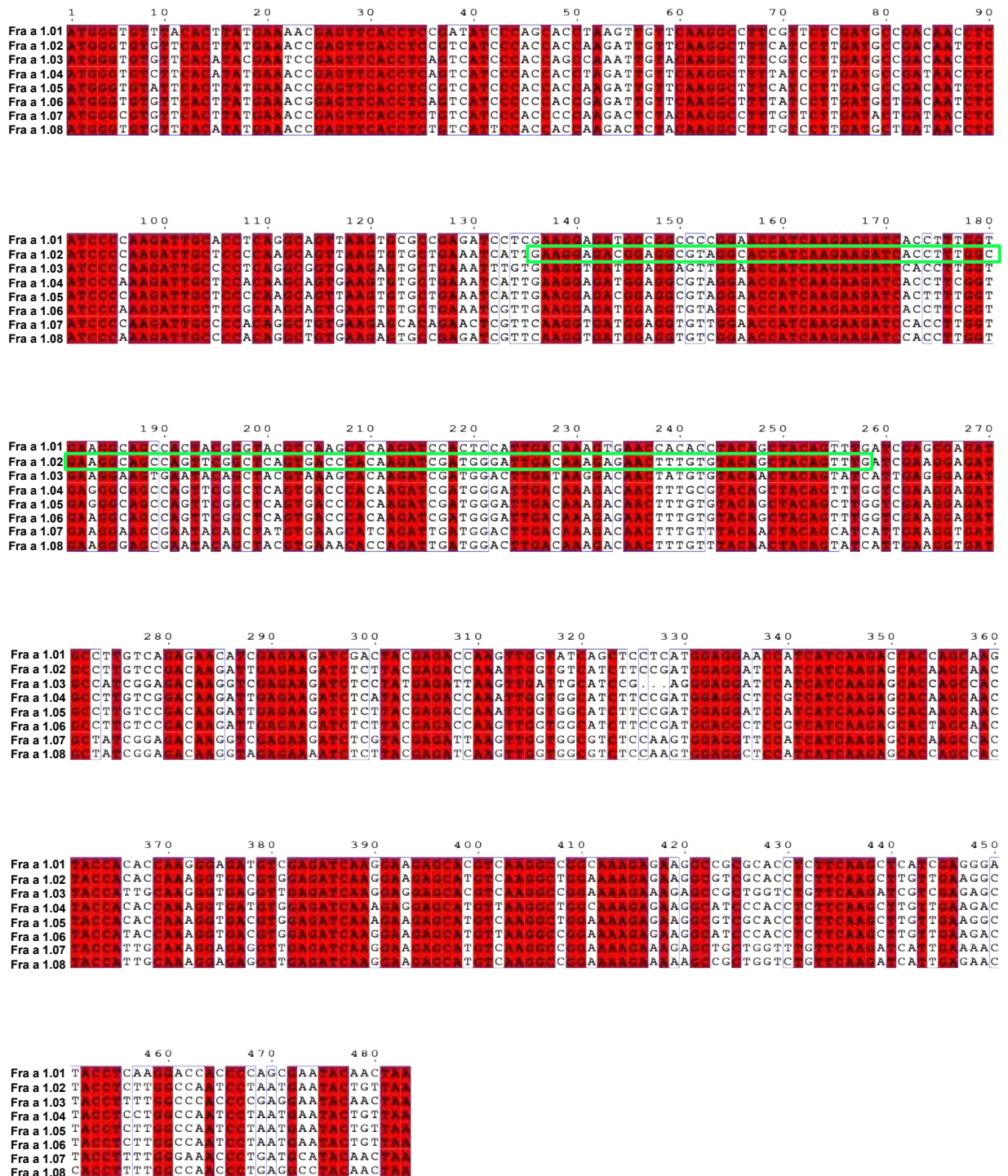


Figura 42.- Alineamiento de las secuencias de *Fra a* 1.01 – *Fra a* 1.08. El rectángulo verde muestra el fragmento de secuencia utilizado para silenciar *Fra a* 1.02. Las regiones en rojo están conservadas en todos los *Fra a* 1. El alineamiento se ha realizado con Clustal Omega (EMBL-EBI, Madeira *et al.*, 2019) y la figura con ESPrnt 3 (Robert & Gouet, 2014).

Se generaron 10 líneas transgénicas independientes de silenciamiento de *Fra a* 1.02 bajo el promotor *CaMV35S* (35S::*Fra a* 1.02i), otras 10 líneas bajo el promotor del

gen *EXP2* de fresa (*EXP::Fra a 1.02i*) y 7 líneas control transformadas con el plásmido vacío pBINPLUS (pBIN). Las líneas se pasaron a tierra y se crecieron en invernadero.

En primer lugar, se evaluó mediante *western blot* con anticuerpos policlonales anti-Fra a 1.02 la cantidad de proteínas Fra a 1, tanto en los frutos control transformados con el vector vacío como en las diferentes líneas de silenciamiento obtenidas (Figura 43). Se incluyeron como control muestras de proteínas Fra a 1.01, Fra a 1.02 y Fra a 1.03 purificadas producidas mediante expresión heteróloga en *E. coli* (Casañal *et al.*, 2013a). Se comprobó que los anticuerpos utilizados reconocían los tres parálogos. En los frutos control, pBIN (L4), se detectaban las proteínas Fra a 1, mientras que en todas las líneas transgénicas de silenciamiento, tanto con el promotor *35S* como con el promotor *EXP2*, no se producía reconocimiento, confirmando, por tanto, que las construcciones empleadas eran efectivas silenciando Fra a 1.

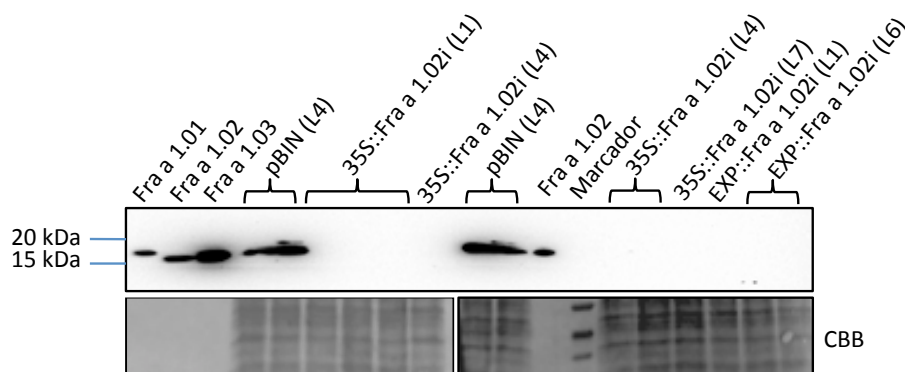


Figura 43.- Comprobación de silenciamiento proteico en los frutos de las líneas transgénicas. *Western blot* de extractos de frutos en estadio rojo de líneas transgénicas que silencian *Fra a 1.02*, tanto con el promotor *35S* como con el promotor *EXP*, y en líneas transgénicas control (pBIN). Se incluyen como controles positivos las proteínas Fra a 1.01, 1.02 y 1.03, purificadas después de su expresión heteróloga en *E. coli*. Las muestras están hibridadas con un anticuerpo anti-Fra a 1.02. En panel inferior corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue* (CBB).

También se estudió el silenciamiento en raíces de las línea silenciadas bajo ambos promotores. De todos los genes *Fra a 1* de fresa, estudios previos del transcriptoma por RNA-seq de plantas de fresa del cv. Camarosa mostraron que solo *Fra a 1.02*, *Fra a 1.04* y *Fra a 1.07* muestran un nivel de expresión detectable en las raíces (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). Por este motivo, también se realizó un *western blot*

en extractos de raíces de plántulas estolonadas en tierra durante una semana. Como se puede ver en la Figura 44 en las plantas control (pBIN) aparecían dos bandas de diferentes tamaños, siendo la más pequeña probablemente de Fra a 1.02 mientras que la de mayor tamaño puede corresponder a Fra a 1.04 o a Fra a 1.07, proteínas que tienen un tamaño similar entre ellas y mayor que Fra a 1.02. En las dos líneas de silenciamiento 35S::Fra a 1.02i disminuían ambas bandas, aunque no desaparecían. Sin embargo, en las plantas transformadas con el promotor específico de frutos, *EXP2::Fra a 1.02i*, no se observaba disminución alguna.

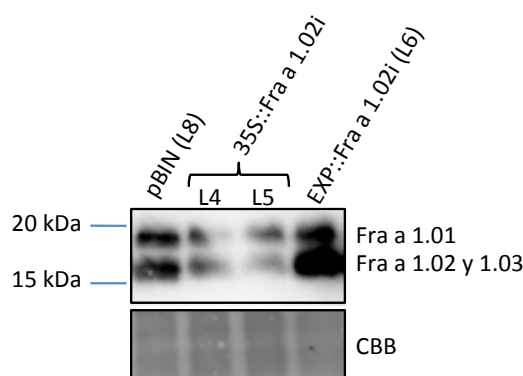


Figura 44.- Comprobación de silenciamiento proteico en las raíces de las líneas transgénicas. El *western blot* está hecho en extractos de raíces maceradas de las líneas transgénicas descritas en el panel. Está hibridado con un anticuerpo anti-Fra a 1.02. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

Dado que el silenciamiento en fruto rojo funcionó en todas las líneas que se testaron por *western blot*, tanto utilizando el promotor 35S (5 líneas testadas) como el de *EXP2* (2 líneas testadas), para la caracterización metabólica y transcriptómica de estos frutos se seleccionaron las líneas transgénicas que produjeron mayor cantidad de frutos para poder realizar todos los análisis con sus correspondientes réplicas. Las líneas seleccionadas fueron pBIN (L4) y pBIN (L5) como controles, y las líneas de silenciamiento 35S::Fra a 1.02i (L4), 35S::Fra a 1.02i (L5) y 35S::Fra a 1.02i (L6). Ninguna de ellas presentó cambios fenotípicos aparentes en tamaño, color y forma de los frutos silenciados en relación a los sin transformar (Figura 45).

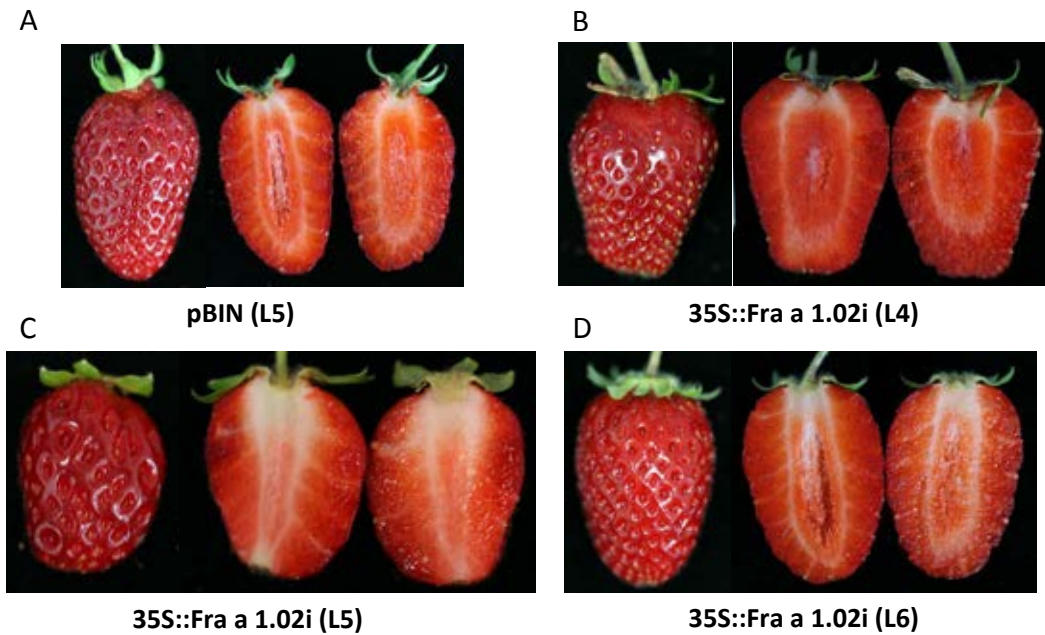


Figura 45.- Frutos en estadio rojo de líneas transgénicas de silenciamiento de Fra a 1.02 bajo el promotor de 35S y del control transformado con el vector vacío.

De cada línea se seleccionaron tres muestras (réplicas biológicas), con un número mínimo de 5 frutos maduros procedentes de plantas diferentes de la misma línea. Las muestras se organizaron de tal manera que no hubiese frutos de la misma planta en diferentes muestras, aunque si había frutos de diferentes plantas en la misma muestra. Antes realizar los análisis de RNA-seq y metabolómica, y como control, se hizo un nuevo estudio por *western blot* de las tres muestras de cada línea (Figura 46) para volver a comprobar que en esas muestras específicas se producía el silenciamiento de manera eficiente, y se vio que había disminución drástica del contenido de las Fra a 1 en las líneas de silenciamiento comparadas con el control. En la muestra 3 de la línea 35S::Fra a 1.02i (L5) se puede apreciar una tenue banda a la altura de Fra a 1.01 pero es muy débil comparada con la banda que aparece en los controles.

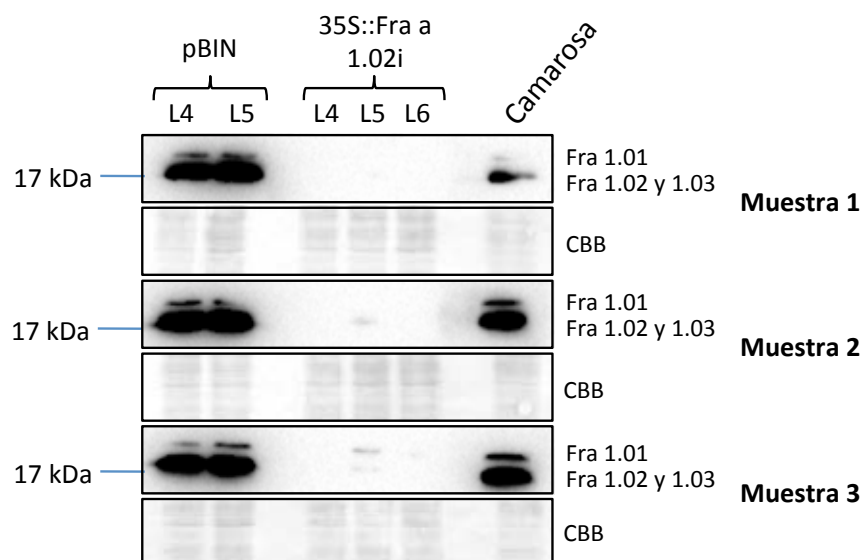


Figura 46.- Estudio mediante *western blot* del silenciamiento en frutos rojos de las líneas seleccionadas. El *western blot* está hecho con frutos en estadio rojo de las líneas transgénicas seleccionadas y de los controles negativos, las líneas transgénicas control (pBIN) y del cv. Camarosa. Está hibridado con un anticuerpo anti Fra a 1.02. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

También se estudió la presencia de proteínas Fra a 1 en los estadios verde y blanco de estas mismas líneas transgénicas (Figura 47) y se observó que en el estadio verde la disminución de la proteína Fra a 1.01, que es la que mayoritariamente se detecta en este estadio, como se puede ver en los controles del cv. Camarosa y pBIN, es muy pequeña con respecto al control, sobre todo en la línea 35S::Fra a 1.02 (L5). En el estadio blanco el silenciamiento es total en el tiempo de exposición observado excepto en la línea 35S::Fra a 1.02i (L5), en la que se observa una tenue banda. En esta misma línea es donde se observaba una tenue banda en los frutos rojos (Figura 46).

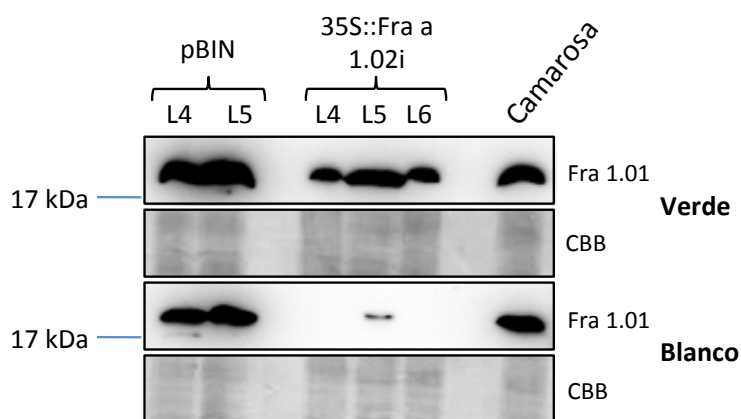


Figura 47.- Estudio mediante *western-blot* del silenciamiento en frutos verdes y blancos de las líneas seleccionadas. El *western blot* está hecho con frutos en estadios verde y blanco de las líneas transgénicas seleccionadas y de las líneas transgénicas control (pBIN) y del cv. Camarosa. Está hibridado con un anticuerpo anti Fra a 1.02. CBB corresponde a la membrana teñida con *Coomassie Brilliant Blue*.

Análisis de metabolitos seleccionados en los frutos de las líneas transgénicas

Para determinar si el silenciamiento de Fra a 1.02 conllevaba una alteración del contenido metabólico de los frutos, se hizo un análisis de metabolitos en las mismas muestras de frutos rojos seleccionadas por *western blot*. El estudio se hizo en el laboratorio del Dr. Wilfred Schwab (Universidad Técnica de Munich, TUM, Munich, Alemania), como parte de la colaboración mantenida con dicho grupo dentro del proyecto conjunto de “Análisis funcional de las proteínas Fra a 1 de fresa”. Se analizó el contenido de algunos de los metabolitos secundarios más importantes en el fruto de fresa tales como diferentes tipos de flavonoides (antocianinas, flavanoles, flavonoles), los fenilpropanoides, y el precursor de todos ellos como la fenilalanina. Además, se analizaron otros compuestos de interés como son los derivados del ácido elágico, que son precursores de los elagitaninos. Como metabolitos primarios importantes, además de la fenilalanina, se han analizado los ácidos cítrico y málico. Estos compuestos no solo son relevantes por el papel central en el metabolismo energético, sino que son los ácidos de mayor contenido en los frutos y, por tanto, determinantes de un elemento de calidad importante como es la acidez total. Por último, se incluyen otros compuestos como el glutatión, por su función central en el estado redox celular, el ácido ascórbico, que es un también un reductor importante y de gran relevancia nutricional, y el glucósido del furaneol (DMHF-Glc) que es un componente esencial en el aroma del fruto.

En la Figura 48 se muestran los valores del contenido de las antocianinas analizadas en las diferentes líneas transgénicas. En ninguno de los compuestos analizados hay diferencias significativas entre las tres líneas transgénicas y los controles. La variabilidad observada entre algunas de las muestras puede estar asociada a pequeñas diferencias en el estado de desarrollo de cada planta en el momento del muestreo, o de las condiciones de cultivo. Los niveles de estos metabolitos en los frutos de fresa en maduración son muy dependientes de ambos factores.

Antocianinas

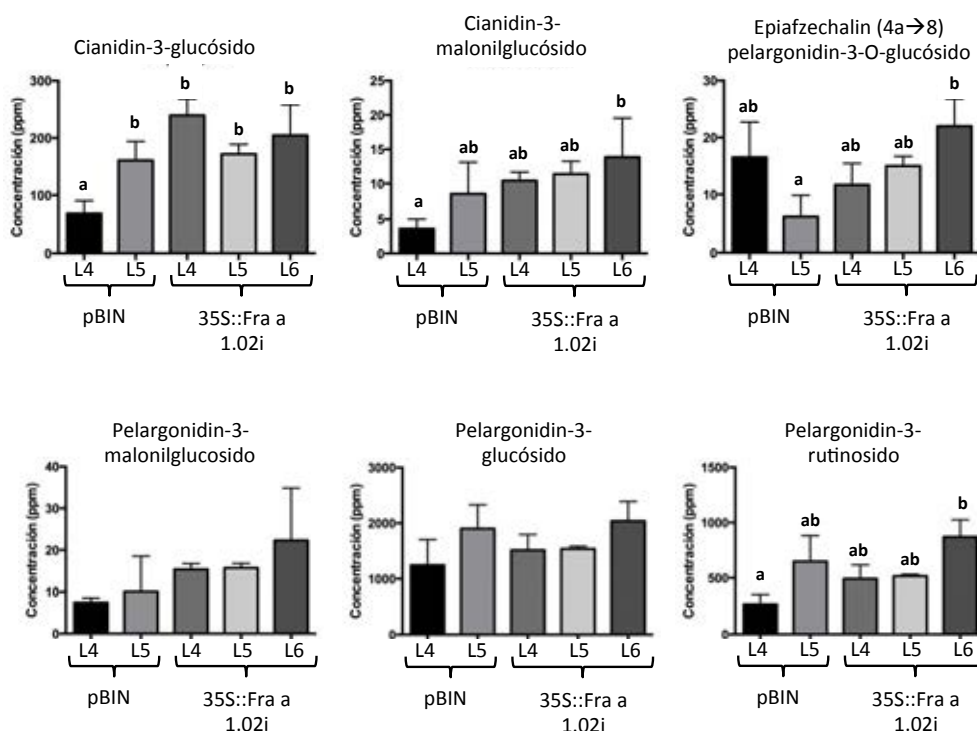


Figura 48.- Concentración de las antocianinas detectadas en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras, las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 49 se pueden ver las concentraciones de los flavanoles analizados en las diferentes líneas transgénicas. Al igual que en el caso anterior no hay una diferencia significativa entre los controles y las líneas transgénicas de silenciamiento. No obstante, se han encontrado diferencias significativas entre algunas de las líneas en (Epi)afzelechín-(epi)catequina dímero 1 y 2, (Epi)afzelechín-(epi)catequina-(epi)catequina trímero y catequina.

Flavanoles

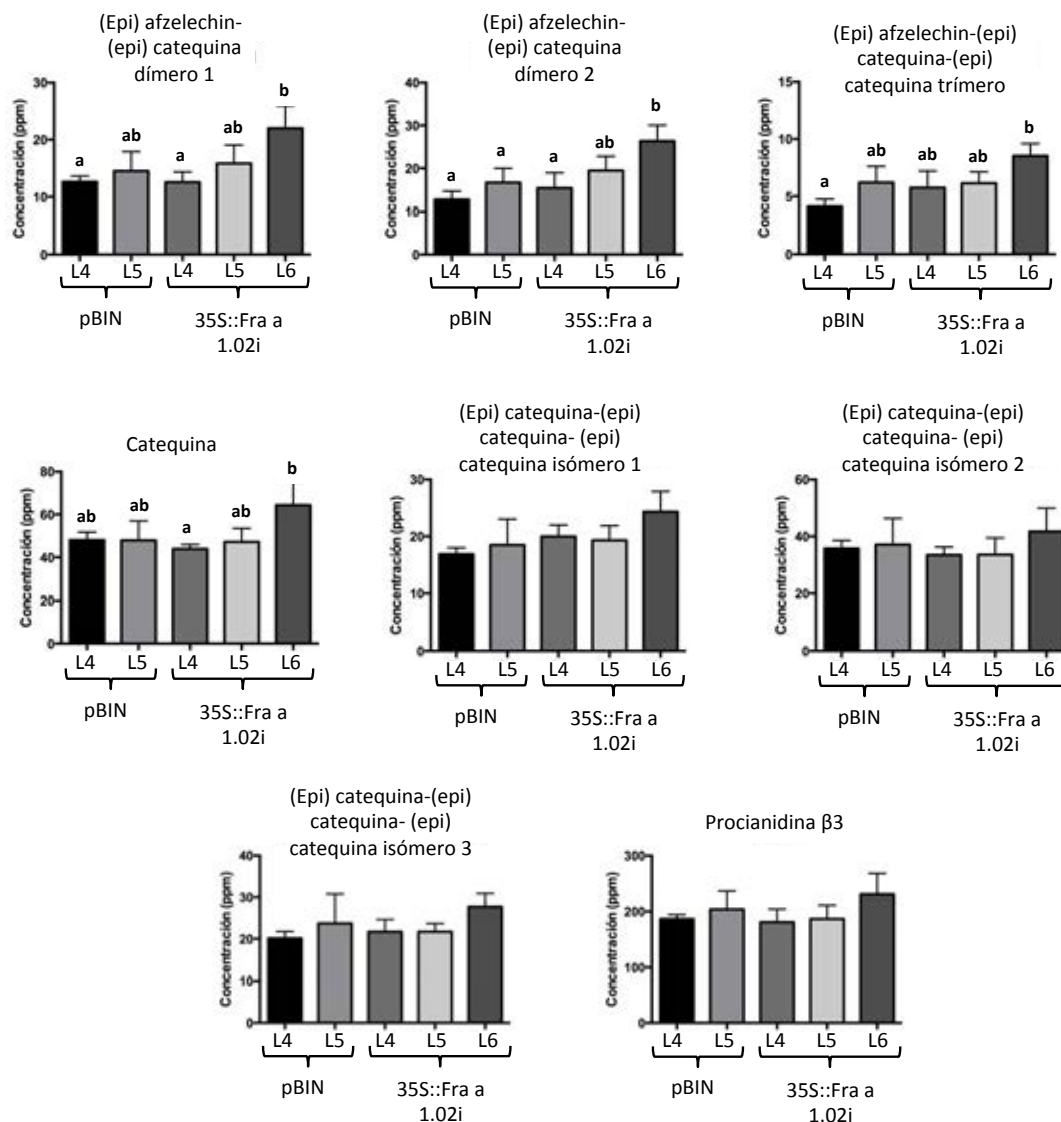


Figura 49.- Concentración de los flavanoides detectadas en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 50 se muestran las concentraciones de los flavonoides medidos en las diferentes líneas transgénicas de silenciamiento. No se observan diferencias entre las líneas transgénicas y el control.

Flavonoles

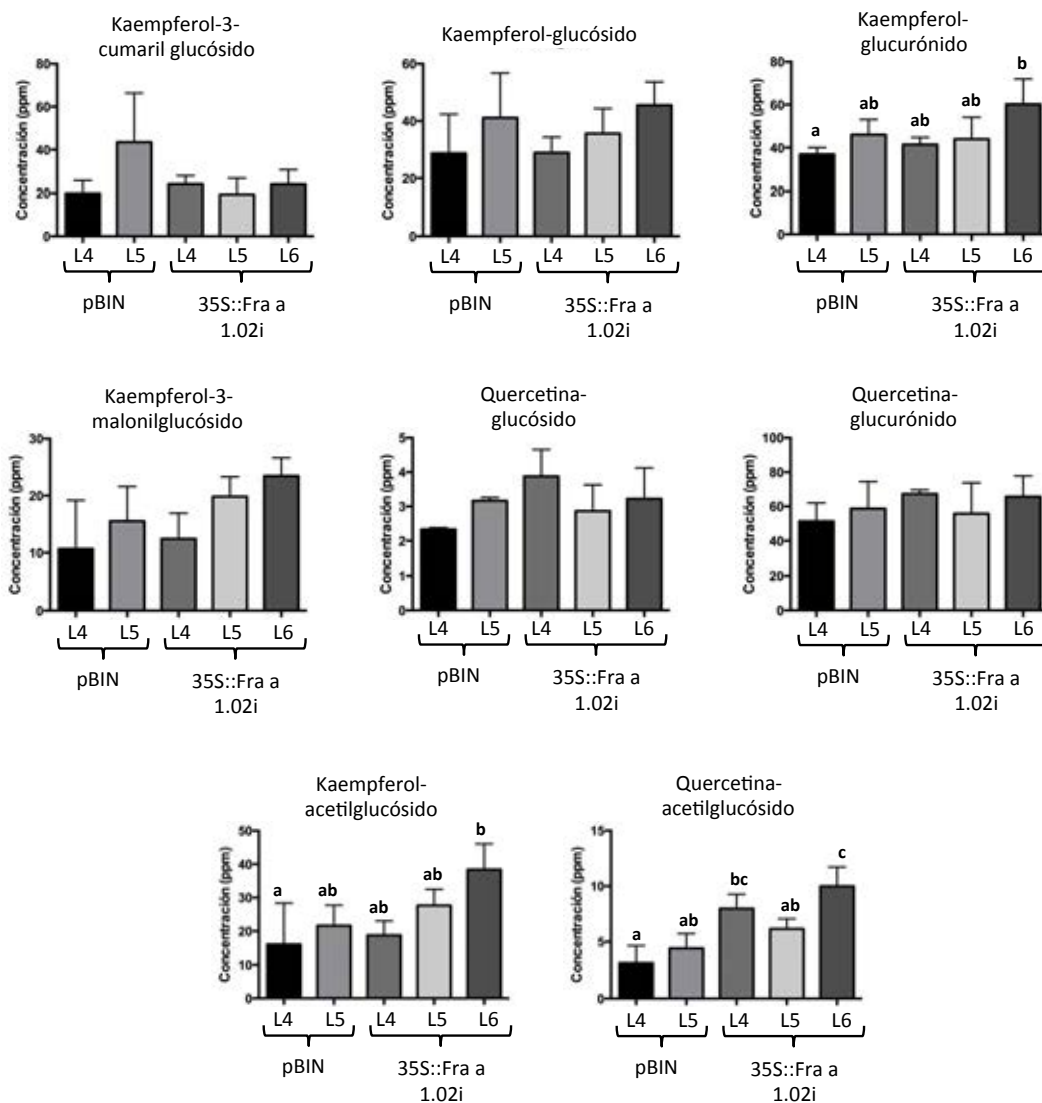


Figura 50.- Concentración de los flavonoides detectadas en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 51 se muestran las concentraciones de los metabolitos derivados del ácido elálgico, que son el propio ácido elálgico y el HHDP-galoil-glucósido. De estos dos compuestos, solo el HHDP-galoil-glucósido tiene diferencias significativas entre las tres líneas silenciadas y uno de los controles.

Derivados del ácido elágico

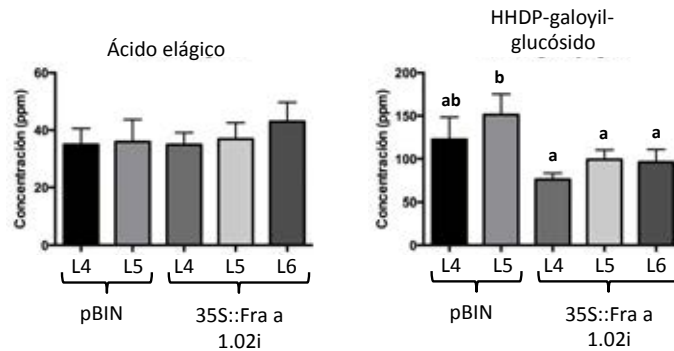


Figura 51.- Concentración de los derivados del ácido elágico detectadas en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 52 se encuentran las concentraciones de los fenilpropanoides analizados. En ninguno de los casos hay diferencia significativa entre ellas, aunque de los dos metabolitos analizados, el p-cumaril-glucosa éster / glucósido, presenta diferencias significativas entre algunas de las líneas.

Fenilpropanoides

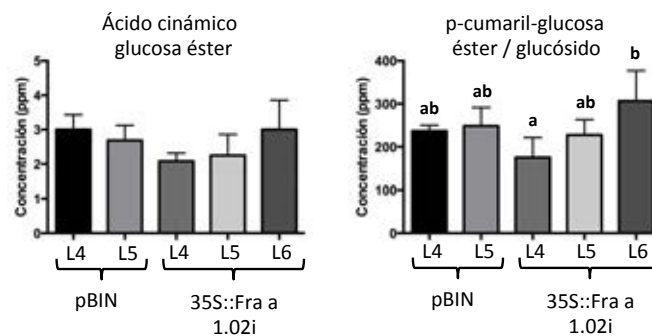


Figura 52.- Concentración de los fenilpropanoides detectadas en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 53 se puede ver la concentración de glutatión oxidado, reducido y el cociente entre ambos en las diferentes líneas transgénicas. En el caso del glutatión reducido, que es mayoritario, hay diferencias, aunque no son significativas en todas las líneas.

Glutatión

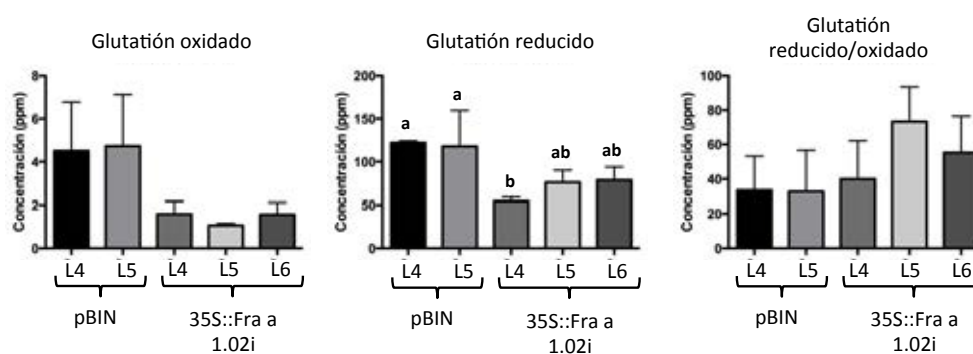


Figura 53.- Concentración de glutatión, oxidado y reducido, en las diferentes líneas transgénicas y los controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En la Figura 54 se muestran las concentraciones de diversos compuestos como el ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona-glucósido (glucósido del furaneol (DMHF-Glc)) y la fenilalanina, que son de especial interés en el fruto de fresa, como se ha indicado anteriormente. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas atribuibles al silenciamiento.

Varios

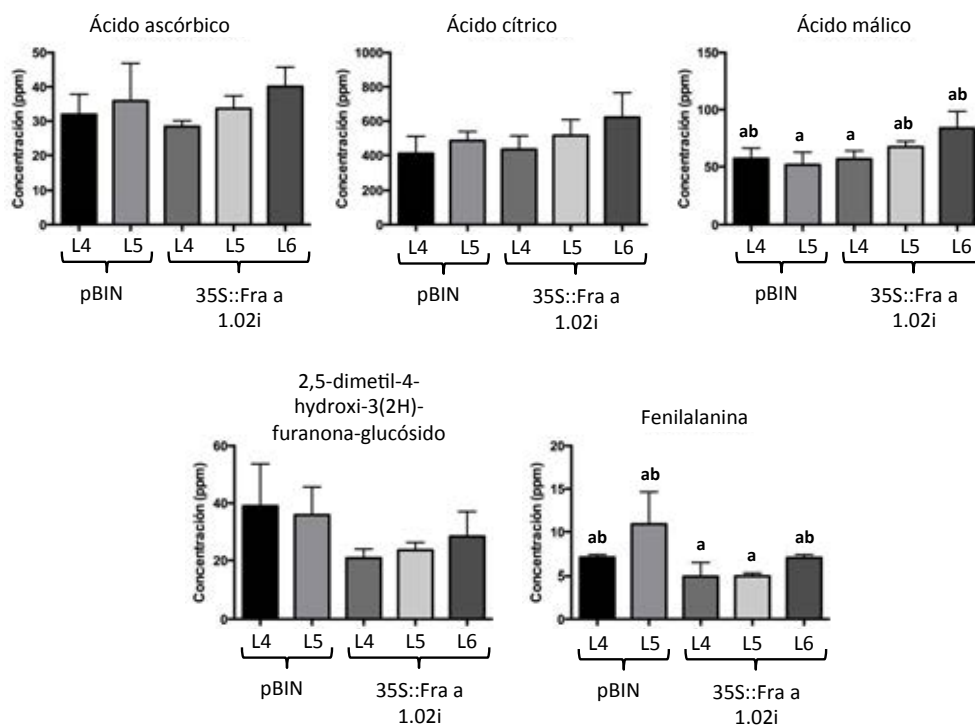


Figura 54.- Concentración de diversos compuestos detectados en las diferentes líneas transgénicas y controles. Los datos de cada línea son un promedio de las medidas de 3 réplicas biológicas, a las que a su vez se le han realizado dos réplicas técnicas. La concentración se expresa en equivalentes de g/kg (ppm). Las líneas verticales muestran la desviación estándar. Las letras muestran los grupos que han sido tomados como estadísticamente iguales según el test múltiples comparaciones de Tukey. En las gráficas que no presentan letras las líneas no son significativamente diferentes.

En ninguno de los metabolitos analizados se han encontrado diferencias significativas entre las tres líneas transgénicas frente a los dos controles, sin embargo, sí se observan tendencias entre silenciadas y no silenciadas, que pueden visualizarse mejor mediante una representación de los datos en formato *HeatMap*. Esto es lo que se representa en la Figura 55. Se puede observar que hay un conjunto de compuestos cuyos contenidos son inferiores, en diferentes grados, en las líneas transgénicas en relación al control. Estos son el glutatión, el HHD-galoil glucósido y DMHF-glc.

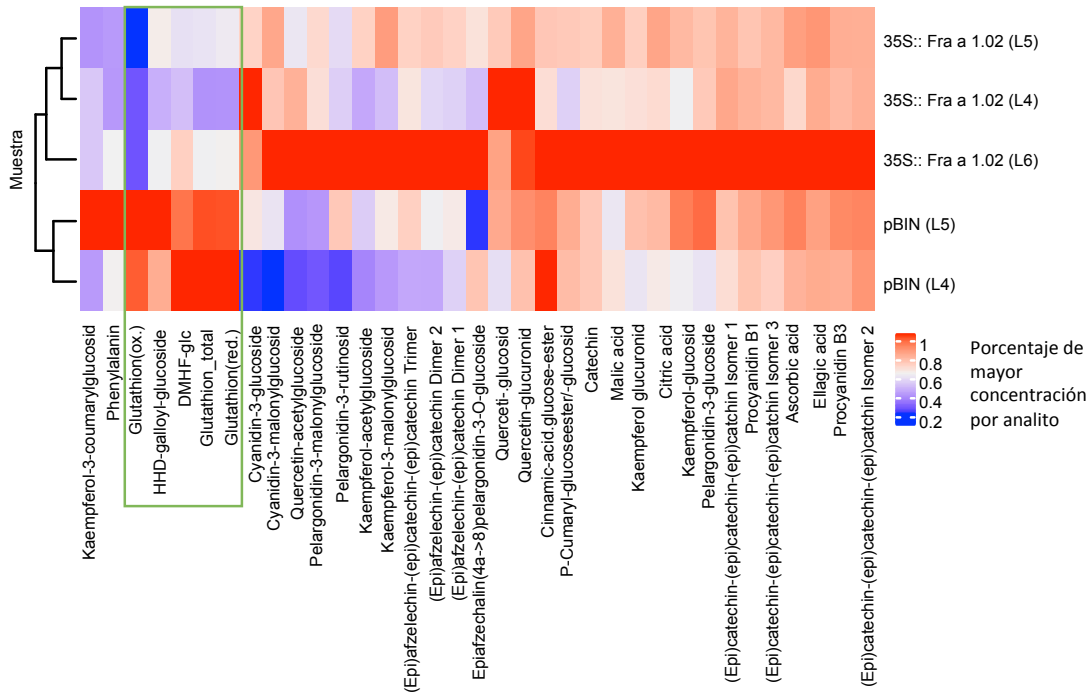


Figura 55.- Heat map de los metabolitos analizados en las líneas de silenciamiento. El recuadro verde destaca los metabolitos con diferencias entre las tres líneas silenciadas y los dos controles.

Diferencias de expresión por RNA-seq en los frutos de las líneas de silenciamiento con respecto a los controles

Para estudiar el transcriptoma de los frutos silenciados mediante RNA-seq se utilizaron los mismos lotes de frutos rojos empleados para el estudio de metabolitos, para los cuales la disminución en el contenido de proteína Fra a 1 se comprobó mediante *western blot*. Al diseñar la construcción de silenciamiento se seleccionó una región de *Fra a 1.02* que fuera lo más específica de este gen, sin embargo, dada la similitud de secuencias en todos los genes Fra a 1 conocidos de *F. x ananassa* (Figura 42), lo primero que se comprobó al tener los resultados del RNA-seq fue el nivel de expresión de todos los miembros de la familia *Fra a 1* en las diferentes líneas (Tabla 6). En general, todos los genes *Fra a 1* resultaron silenciados, sin embargo, el grado de silenciamiento fue diferente entre los diferentes miembros de la familia. Así, los genes *Fra a 1.02*, *Fra a 1.04*, *Fra a 1.05* y *Fra a 1.06* estaban silenciados en un valor superior al 90 %, mientras que *Fra a 1.01*, *Fra a 1.03*, *Fra a 1.07* estaban silenciados en torno al 50 % y, por último, el silenciamiento del *Fra a 1.08* era del 22,1 %. Estos valores están de acuerdo con el nivel de homología entre los genes de la familia (Figura 5). La comparación entre las diferentes líneas transgénicas muestra que la *35S::Fra a 1.02i*

(L5) es la línea que presenta menor silenciamiento general, lo que concuerda con los resultados previos de proteínas obtenidos en los frutos obtenidos por *western blot* (Figura 46).

Tabla 6.- Expresión de los diferentes *Fra a 1* en las diferentes líneas transgénicas. Los niveles de expresión están expresados en FPKM. El porcentaje de silenciamiento está calculado en relación al control para la media de las líneas de silenciamiento.

Gen	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	Silenciamiento (%)
<i>Fra a 1.01</i>	138,2	66,7	74,6	58,4	51,8
<i>Fra a 1.02</i>	367,5	12,6	54,1	19,7	92,2
<i>Fra a 1.03</i>	436,6	144,5	318,3	156,0	52,7
<i>Fra a 1.04</i>	35,0	1,0	5,8	0,6	93,1
<i>Fra a 1.05</i>	64,2	3,2	7,2	2,1	93,5
<i>Fra a 1.06</i>	73,5	1,6	7,1	2,2	95,1
<i>Fra a 1.07</i>	29,2	6,4	20,9	9,4	58,2
<i>Fra a 1.08</i>	447,0	373,9	314,3	356,7	22,1

El análisis de la expresión diferencial de todos los genes se hizo comparando la expresión de cada una de las líneas silenciadas con la media de los dos controles. La comparación con la media de los controles tenía el objetivo de facilitar los análisis estadísticos posteriores. El criterio de significatividad utilizado para determinar los genes diferencialmente expresados fue de un valor $p < 0,002$, como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos. El resultado de este análisis mostró que había 419 genes diferencialmente expresados de forma significativa entre las líneas silenciadas comparadas con el control (Anexo I).

El primer análisis que se hizo de los genes diferencialmente expresados fue la determinación de las categorías GO de dichos genes, agrupadas en tres grandes grupos funcionales, que son Procesos biológicos, Componentes celulares y Funciones moleculares (Anexo II). En relación a los Procesos Biológicos la distribución de genes diferencialmente expresados se representan en la Figura 56. La categoría más representada dentro de Procesos Biológicos es la de “Procesos de oxidación-reducción” (20 %), siendo casi el doble de la siguiente categoría de “Procesos metabólicos” (11 %). Las siguientes categorías más representadas son las de “Regulación de la transcripción” (7 %) y “Transporte transmembrana” (7 %).

Procesos biológicos

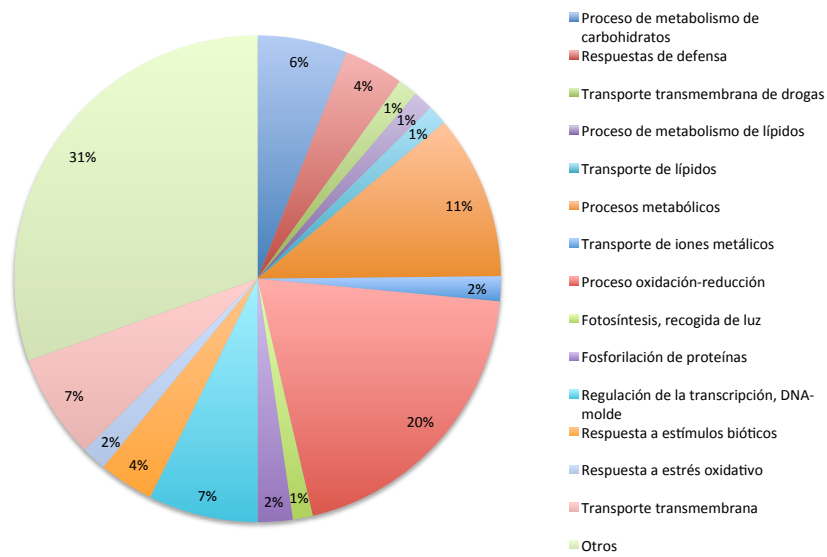


Figura 56.- Términos GO de los procesos biológicos de los genes diferencialmente expresados en las líneas transgénicas.

En los Componentes Celulares (Figura 57) los términos GO más representados fueron la “Membrana” y los “Componentes integrales de membrana”, representando un 37 % y 26 % respectivamente.

Componentes celulares

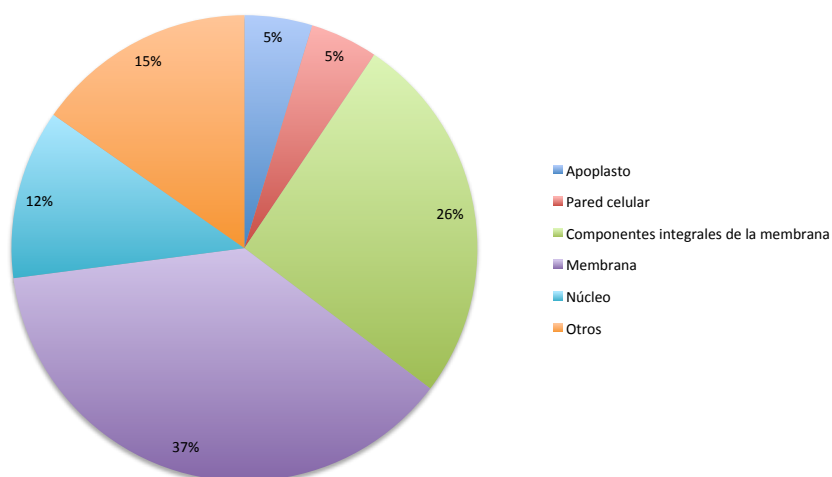


Figura 57.- Términos GO de los componentes celulares de los genes diferencialmente expresados en las líneas transgénicas.

Y, por último, en la relación a la Función Molecular (Figura 58) la distribución de los términos GO es mucho más dispersa por el mismo concepto de “Función molecular”, y por tanto menos informativa. De todas formas, destacan como los más representadas la de “Actividad oxidoreductasa” (8 %) y la de “Unión al ADN” (5 %).

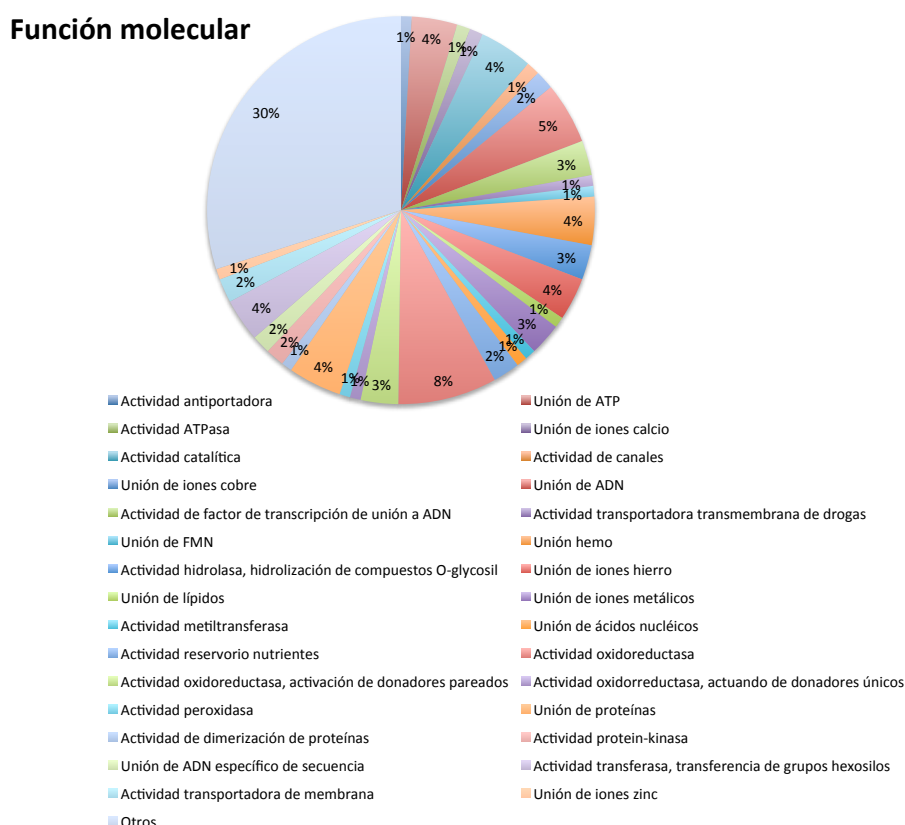


Figura 58.- Términos GO de las funciones moleculares de los genes diferencialmente expresados en las líneas transgénicas.

Al analizar más detalladamente los genes que se engloban dentro de las categorías mayoritarias se han encontrado algunas diferencias de expresión que podrían ser relevantes para dilucidar la posible función de la familia Fra a 1. También se ha estudiado si las tendencias que presentaban los frutos transgénicos en el contenido de metabolitos estaban justificadas por cambios en la expresión génica. Mientras que en el caso del glutatión se encontraron cambios transcripcionales relacionados con este metabolito, no fue así para otros dos compuestos con diferencias entre las transgénicas y el control, el HHD-galoil glucósido y DMHF-glc. En la síntesis de estos últimos participan enzimas UDP-glicosil transferases (*UGT*) (Schulenburg *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2019). Entre los genes diferencialmente expresados hay nueve *UGTs* (Anexo I),

aunque ninguno de ellos tiene asignada una función específica en la síntesis de estos compuestos.

- **Genes del metabolismo del Glutación están diferencialmente expresados en las líneas transgénicas que silencian *Fra a 1.02***

El análisis de los términos GO en los genes diferencialmente expresados mostró que el Proceso biológico más representado correspondía a los de "oxidación-reducción" (Figura 56). Por otro lado, el análisis metabolómico había mostrado una tendencia a la disminución en el contenido de glutación reducido (GSH) en las líneas silenciadas, aunque los cambios no eran significativos en todas las líneas. Por lo que se estudiaron los genes implicados en su síntesis y degradación.

El GSH (γ -Glu-Cys-Gly) es sintetizado en las plantas a partir de los aminoácidos que lo constituyen en dos pasos catalizados por las enzimas Glu-Cys ligasa (GCL) y Glutación sintetasa (GSS), y que requieren ATP (Noctor *et al.*, 2012). El análisis transcriptómico de los correspondientes genes ortólogos en fresa reveló que estos no están diferencialmente expresados (Tabla 7). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes correspondientes a la síntesis de los aminoácidos precursores del glutación, y se observó que el gen que codifica *cisteína sintasa (OASTL)* tiene disminuida su expresión en las líneas silenciadas, al igual que los genes *glutamina sintetasa (GS)* y *glutamato sintetasa (FaGLS/GOGAT)* (Tabla 7). Asimismo, los genes de las enzimas *glutamato deshidrogenasa (GDH1 y GDH2)* tenían menor expresión en las líneas silenciada (Tabla 7). También se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes correspondientes a las enzimas implicadas en su degradación. Tanto la γ -glutamyl transpeptidasa (*GGT*) como una de las dos γ -glutamyl ciclotransferasa (*GGC*) muestran una disminución significativa de su expresión en las líneas transgénicas silenciadas (Tabla 7).

Al analizar la expresión de las enzimas implicadas en la reducción del glutación, enzimas glutación reductasas (GR), se comprobó que no había diferencias significativas en los niveles de expresión de éstas entre las líneas transgénicas control y las silenciadas (Tabla 7). Este resultado está concordancia con los experimentos de metabolómica que

no encontraron diferencias en el cociente entre las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión.

Tabla 7.- Expresión de las enzimas relacionadas con el la síntesis, catabolismo y reducción del Glutatión entre las líneas de silenciamiento y el control. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), Con fondo morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control.

Gene	<i>F. vesca</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
Síntesis GSH						
Glu-Cys ligasa (GCL)	FvH4_5g02350	58,1	54,2	52,4	51,3	
Glutatión sintetasa (GSS)	FvH4_6g05260	19	12,5	15,2	13,6	
Degradación GSH						
Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT)	FvH4_1g06610	45,3	24,6	30,6	27,7	*
Gamma-glutamyl ciclotransferasa (GGC)	FvH4_2g36480	206,8	203,4	204,8	210	
Gamma-glutamyl ciclotransferasa (GGC)	FvH4_2g36490	27,5	12,5	19,2	14,7	*
Síntesis Cys						
Cys sintasa (OASTL)	FvH4_6g03790	8,8	4,1	3,9	3,9	*
Síntesis Glu						
Glutamina sintetasa (GS)	FvH4_5g17650	22,2	9,7	9,5	10,6	*
Glu sintasa (GLS/GOGAT)	FvH4_7g31770	42,8	24,6	31,5	25,2	*
Degradación Glu						
Glu deshidrogenasa (GDH1)	FvH4_1g28120	9,5	3,9	4,9	6,1	*
Glu deshidrogenasa (GDH2)	FvH4_7g26540	14,9	9,5	8,7	8,8	*
Reducción GSSG						
GSH reductasa cloroplástica (GRcl)	FvH4_2g22490	25,5	21,8	22,3	21,3	
GSH reductasa citosólica (GRcit)	FvH4_4g00450	314,8	267,9	299,9	237,7	

El glutatión, además de una función importante en la señalización redox por su capacidad reductora, desempeña también funciones importantes en defensa/detoxificación (Noctor *et al.*, 2012). En estos procesos, el GSH se conjuga a otros compuestos por medio de las enzimas glutatión transferasas (GSTs). Las enzimas glutatión transferasas (GST, EC 2.5.1.18), entre otras funciones, catalizan la transferencia del GSH a un co-sustrato (R-X) que contiene un centro electrofílico reactivo para formar un producto polar S-glutationilado (R-SG) (Noctor *et al.*, 2012).

Las *GSTs* en plantas están representadas por familias génicas grandes (Dixon *et al.*, 2002). Están clasificadas en 14 clases, habiendo también una diferencia adicional entre las que tienen Ser o Cys en el centro activo (Lallement *et al.*, 2014). En el genoma de *F. vesca* se han identificado 67 genes *GST* (Edger *et al.*, 2017). El dendrograma

generado a partir de las secuencias de aminoácidos de las diferentes GSTs de *F. vesca* (Figura S4) ha revelado que se encuentran presentes las GSTs de las diferentes familias características de las plantas (Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019). De ellas, hay un total de 9 que están diferencialmente expresadas en los frutos de las líneas silenciadas en relación al control. En la Tabla 8 se pueden ver los valores de expresión de dichos genes. Al no haber una anotación específica para las GSTs de fresa se incluye en la Tabla 8 el correspondiente gen que en *Arabidopsis* presenta la mayor homología al gen de fresa.

Tabla 8.- GST diferencialmente expresadas en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control.

<i>F. vesca</i>	<i>Arabidopsis</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
FvH4_1g30090	AT1G65820	48,5	31,8	34,5	34,5	*
FvH4_2g20010	AT2G29470 (ATGSTU3, GST21)	10,0	2,2	3,2	1,3	*
FvH4_2g20020	AT2G29440 (ATGSTU6, GST24)	5,2	1,5	1,5	1,0	*
FvH4_2g20060	AT2G29490 (ATGSTU1, GST19)	0,7	0,2	0,2	0,1	*
FvH4_2g20070	AT3G09270 (ATGSTU8)	27,6	8,8	9,4	7,0	*
FvH4_2g20080/FvH4_2g20090	AT2G29420 (ATGSTU7, GST25)	19,7	4,6	3,3	3,2	*
FvH4_2g25180	AT3G62760 (ATGSTF13)	8,2	4,7	4,6	4,5	*
FvH4_6g12680	AT2G29420 (ATGSTU7, GST25)	62,4	15,4	20,7	22,1	*
FvH4_6g38760/RAP-L1	AT2G30860 (ATGSTF9, GSTF9)	38,4	12,5	12,1	10,3	*

- **Alteraciones de la expresión de transportadores en las líneas transgénicas**

Dentro de la categoría Componente Celular, “membranas” es el más representado entre los genes diferencialmente expresados (Figura 57) entre los frutos que silencian *Fra a 1.02* y control, y dentro de la categoría Procesos Biológicos el transporte transmembrana es el tercero más representado (Figura 56). Para determinar qué genes diferencialmente expresados sustentan estas categorías GO se estudió la expresión de diferentes transportadores de membrana.

Entre los genes diferencialmente expresados se identifican cuatro genes de la familia de transportadores ABC, que muestran una disminución significativa de su expresión en los frutos silenciados (Tabla 9). Esto es de especial interés dado que se ha sugerido que la unión de ligandos a GST puede ser transitoria y que está seguida por su

liberación a transportadores del tipo ABC para su secuestro en vacuola (Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019).

Tabla 9.- Transportadores ABC diferencialmente expresadas en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control.

<i>F.vesca</i>	<i>Arabidopsis</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
FvH4_1g20390	AT1G17840 (ABCG11)	2,8	0,8	0,5	0,5	*
FvH4_1g26280	AT4G01820 (ABCB3, PGP3)	2,6	1,7	1,6	1,7	*
FvH4_4g21380	AT2G47000 (ABCB4, PGP4)	1,4	0,3	0,2	0,2	*
FvH4_6g21010	AT3G52310 (ABCG27)	2,2	0,9	0,8	0,9	*

Hay otras familias de proteínas de membrana, las *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE), también conocidas como proteínas *Detoxification Efflux Carrier* (DTX), que están involucradas en una serie de funciones como el transporte de metabolitos secundarios, detoxificación de xenobióticos y la resistencia a enfermedades (Upadhyay *et al.*, 2019). Hay 3 genes de la familia MATE que están diferencialmente expresados de forma significativa en los frutos silenciados en *Fra a 1* relación al control (Tabla 10). Dos de estos genes, FvH4_5g16890 y FvH4_5g36170, tienen menor expresión en los frutos silenciados en *Fra a 1*. El tercer gen, FvH4_7g30070, aumenta significativamente su expresión en los frutos transgénicos (Tabla 10). En los frutos de fresa se ha descrito una proteína de esta familia, FaTT12-1, que correspondería al gen FvH4_2g26470 de *F. vesca*, implicada en la acumulación de proantocianidinas en los frutos (Chen *et al.*, 2018). Sin embargo, en los frutos silenciados de *Fra a 1* no se encontró diferencia significativa en la expresión de este gen en relación al control (Tabla 10).

Tabla 10.- Expresión de algunos de los genes de la familia MATE en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control y en verde los que la aumentan.

<i>F.vesca</i>	Arabidopsis	pBIN	35S:: <i>Fra a</i> 1.02i (L4)	35S:: <i>Fra a</i> 1.02i (L5)	35S:: <i>Fra a</i> 1.02i (L6)	
FvH4_5g16890	AT5G52450 (AtDTX16)	19,5	8,8	8,2	7	*
FvH4_5g36170	AT5G65380 (AtDTX27)	29,2	16,7	15,2	15,2	*
FvH4_7g30070	AT4G25640 (AtDTX35)	17	26,9	24,2	25,2	*
FvH4_2g26470	AT3G59030 (AtDTX41)	7,3	9,4	8,5	9,1	

- **Diferencias de expresión en las líneas transgénicas de genes relacionados con la síntesis y señalización del ácido jasmónico**

En las categorías GO de los genes diferencialmente expresados en los frutos silenciados en las *Fra a 1*, la ``respuesta de defensa`` es otra de las categorías más representada (Figura 56). Así, en los genes diferencialmente expresados en los frutos silenciados se encuentran representados genes relacionados con la síntesis, conjugación y señalización del ácido jasmónico (JA), hormona implicada en la respuesta de defensa, (Tabla 11). La ruta de biosíntesis del JA es plastidial inicialmente y se inicia a partir del ácido α -linolénico, procedente de los galactolípidos, en tres pasos sucesivos catalizados por las enzimas 13-LOX, AOS y AOC hasta producir el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) (Figura S5) (Wasternac & Song, 2016). De los 3 pasos metabólicos, en dos de ellos (13-LOX y AOS) se han encontrado genes diferencialmente expresados en los frutos silenciados en *Fra a 1*, mientras que en el tercero (AOC) la diferencia es significativa en solo dos de las líneas silenciadas (Tabla 11), sin embargo, se aprecia la misma tendencia en las tres. En el caso de la 13-LOX, se han identificado dos genes diferencialmente expresados, uno con expresión disminuida con respecto al control y el otro con la expresión aumentada. En el caso de *AOC4*, como se ha indicado antes, es significativo en dos de las líneas transgénicas (L4 y L5), mientras que en la L6 no es significativa, pero con un valor de $p = 0,0031$, siendo el límite de significatividad $p = 0,002$. Posteriormente, en los peroxisomas, el OPDA es reducido por la OPDA reductasa (OPR3) hasta el ácido 8-(3-oxo-2-(pent-2-enil) ciclopentenil) octanoico (OPC-8). También un gen *OPR3* de fresa tiene expresión disminuida en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Tabla 11).

Recientemente, se ha demostrado que existe una ruta de síntesis de JA independiente de OPR3 (Chini *et al.*, 2018). En esta ruta el paso final de reducción del 4,5-didehidro-JA a JA es catalizado por OPR2 en el citosol. También el gen

correspondiente al *OPR2* de *Arabidopsis* en fresa muestra menor expresión en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Tabla 11). Una posibilidad de conjugación del JA es su metilación hasta MeJA (Wasternac & Song, 2017). El derivado metilado no es activo *per se* y tiene que ser convertido a JA por medio de metilasas (JMT). En los frutos de fresa se ha detectado la expresión de una *JMT* que se correlaciona negativamente con el desarrollo del fruto (Preuß *et al.*, 2014). Este gen (FvH4_2g39450) también está diferencialmente expresado en los frutos en los que *Fra a 1* está silenciado, mostrando una reducción de su expresión (Tabla 11). Además, una hidrolasa, que en *Arabidopsis* tiene asignada una función en la desmetilación del JA (MES1), tiene un gen correspondiente en fresa que también está parcialmente silenciado en los frutos transgénicos que silencian *Fra a 1* (Tabla 11). Sin embargo, el correspondiente al gen *JAR1* de *Arabidopsis* en fresa (FvH4_7g16040), cuyo enzima catalizaría la conjugación de JA hasta la forma de percepción JA-Ile, no está diferencialmente expresada en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Anexo I).

Tabla 11.- Expresión de algunos de los genes de síntesis y conjugación del ácido jasmónico diferencialmente expresados en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control y en verde los que la aumentan. El asterisco azul indica que la disminución en el nivel de expresión es significativo solamente en dos de las tres líneas transgénicas.

<i>F.vesca</i>	<i>Arabidopsis</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
FvH4_6g34970	AT1G72520 (13-LOX4)	6,2	4,2	3,8	3	*
FvH4_7g00440	AT3G45140 (13-LOX2)	32,7	65	65,1	60,5	*
FvH4_5g16260	AT5G42650 (AOS)	1,6	0,4	0,4	0,2	*
FvH4_6g45370	AT1G13280 (AOC4)	4,4	2,3	2,1	2,7	*
FvH4_1g08500	AT2G06050 (OPR3)	2,8	0,7	1	0,9	*
FvH4_5g32690	AT1G76690 (OPR2)	3,7	0,6	0,3	0,5	*
FvH4_5g32710	AT1G76680 (OPR1)	20,4	8,4	9,9	9,5	*
FvH4_2g39450	AT1G19640 (JMT)	22,4	10,3	9,6	10,6	*
FvH4_1g14820	AT2G23620 (MES1)	9,6	1,6	3,2	2,8	*

En relación a la señalización por JA-Ile, las proteínas JAZ participan por su actividad represora en la expresión de genes de TFs (Chini *et al.*, 2016). La acumulación de la forma activa JA-Ile induce la interacción de la F-box COI1 y JAZ, resultando en la degradación de esta última y la liberación de la represión. En las

plantas silenciadas en *Fra a 1* se encuentra también una disminución significativa en la expresión de los genes homólogos a *JAZ1* y *JAZ8* de *Arabidopsis* (Tabla 12). Diferentes TFs, de diversas familias, han sido descritos como dianas de los JAZ (Chini *et al.*, 2016). Entre ellos, algunos miembros de la familia bHLH como GLABRA3 (GL3) que participa en la acumulación de antocianinas y la formación de tricomas en *Arabidopsis* (Qi *et al.*, 2011). El gen correspondiente de fresa presenta una disminución significativa de su expresión en los frutos transgénicos silenciados (Tabla 12).

Tabla 12.- Expresión de los genes de señalización del ácido jasmónico diferencialmente expresados en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control.

<i>F.vesca</i>	<i>Arabidopsis</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
FvH4_1g09070	AT1G19180 (TIF10A/JAZ1)	15,9	8,9	9,8	8,9	*
FvH4_3g05370	AT1G30135 (TIFY5A/JAZ8)	12,2	7,6	6,9	5,7	*
FvH4_5g02520	AT1G63650 (GL3/GLABRA)	10,1	7,1	7,3	5,9	*
FvH4_3g26130	AT1G08465 (YABBY2)	1,7	0,8	0,7	0,8	*

Los genes YABBY pertenecen a una familia de TFs que en *Arabidopsis* tiene 6 miembros, y cuatro de ellos (*YAB1*, *YAB2*, *YAB3* y *YAB5*) tienen funciones solapantes en el desarrollo foliar (Sarojam *et al.*, 2010). De estos, *YAB1* y *YAB3* se ha demostrado que interaccionan con *JAZ3* (Boter *et al.*, 2015), por medio del dominio ZIM, que también está en *JAZ1* (Chini *et al.*, 2016). Aunque los genes correspondientes a *YAB1* y *YAB3* no están diferencialmente expresados en los frutos con *Fra a 1.02* silenciados, sí lo está el correspondiente a *YAB2* (Tabla 12).

- **Diferencias de expresión en las líneas transgénicas de genes correspondientes a miembros de la familia *WRKY***

La "regulación de la transcripción" es otro de los Procesos Biológicos más representados en las categorías GO de los genes diferencialmente expresados (Figura 56). Entre los genes incluidos en esta categoría están los que codifican TFs. Algunos se han comentado con anterioridad, pero una de las familias más representada son los genes *WRKY*, que también están implicados en defensa (Pandey & Somssich, 2009).

Todos ellos presentan una expresión disminuida en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Tabla 13).

Tabla 13.- Expresión de los genes WKRYs y VQ diferencialmente expresados en las líneas de silenciamiento y su correspondencia por homología en *Arabidopsis*. Los valores están expresados en FPKM. Con asterisco rojo se indican las diferencias que son significativas entre el control y las tres líneas de silenciamiento ($p < 0.002$), en morado se indican los genes diferencialmente expresados que disminuyen su expresión frente al control.

<i>F.vesca</i>	<i>Arabidopsis</i>	pBIN	35S::Fra a 1.02i (L4)	35S::Fra a 1.02i (L5)	35S::Fra a 1.02i (L6)	
FvH4_6g10510	AT2G38470 (AtWRKY33)	16,3	10,5	8,8	7,1	*
FvH4_1g26980	AT2G47260 (AtWRKY23)	5,8	3,2	2,3	2,9	*
FvH4_3g06200	AT4G18170 (AtWRKY28)	3,1	1,7	1,7	1,2	*
FvH4_3g39850	AT2G38470 (AtWRKY33)	14,6	8,6	9,2	7,7	*
FvH4_4g20230	AT5G49520 (AtWRKY48)	31,7	22,1	22,1	21,7	*
FvH4_7g03520 (FaVQ25)	AT3G56710 (AtVQ23)	12,4	6,9	3,6	4,2	*

Se ha descrito que las proteínas de plantas con un motivo VQ tienen la capacidad de interactuar con los TFs, incluidos algunos WRKY, modulando de esta forma su actividad transcripcional (Jing & Lin, 2015). En la fresa se han identificado 25 genes codificantes de estas proteínas (Garrido-Gala *et al.*, 2019). De éstos, *FaVQ25* (*FvH4_7g03520*) presenta una disminución en su expresión en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Tabla 13).

Discusión

La función molecular de las proteínas *Fra a 1* es desconocida hasta la fecha, por este motivo se pensó en generar plantas de fresa transgénicas que silenciases el gen *Fra a 1.02*, que es la más abundante en fruto rojo (Muñoz *et al.*, 2010), para poder tener una prueba funcional que arrojarase alguna pista sobre su función. La generación de plantas transgénicas de silenciamiento con dos promotores diferentes, el 35S, de expresión constitutiva, y el *EXP2*, específico de frutos, se debió a que la expresión de *Fra a 1.02* es elevada en raíces (Casañal, 2014) y el uso del promotor 35S pudiera haber causado que la planta silenciada resultante no fuera viable. Pero no hubo una diferencia en la viabilidad de las plantas silenciadas bajo el promotor 35S y el de *EXP2* por lo que, para su estudio, se usaron las plantas silenciadas bajo el promotor 35S. El estudio posterior de las líneas con el promotor *EXP2* puede ayudar a conocer la función específica en

frutos maduros de *Fra a 1.02* que es la de mayor expresión, con mucha diferencia en relación a las otras *Fra a 1*, en este estadio (Muñoz *et al.*, 2010, Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017).

Dada la gran homología que presenta esta familia de proteínas entre sus diferentes miembros (entre el 72 y el 98 %), y a pesar de que se intentó seleccionar una parte del gen de *Fra a 1.02* lo más específica posible para la construcción RNAi (Figura 42), el silenciamiento no solo se dio en *Fra a 1.02* si no que los demás miembros de la familia se silenciaron, aunque con diferentes grados. Así, *Fra a 1.02*, *Fra a 1.04*, *Fra a 1.05* y *Fra a 1.06* se silenciaron en valores superiores al 90 %, mientras que *Fra a 1.01*, *Fra a 1.03*, *Fra a 1.07* se silenciaron en torno al 50 % y, por último, el silenciamiento del *Fra a 1.08* fue del 22,1 %. Estos datos concuerdan con el nivel de homología que presentan estos genes entre ellos, por lo que se puede descartar que la disminución de la expresión de todos los genes *Fra a 1* como consecuencia del silenciamiento de *Fra a 1.02* se deba a algún tipo de interacción transcripcional entre ellos, sino más bien se podría pensar que es el resultado de la gran homología que tienen los miembros de la familia *Fra a 1*, que no permite hacer un silenciamiento específico de alguno de los miembros utilizando RNAi.

En cuanto al fenotipo del fruto de las líneas silenciadas no se han observado diferencias en el color de estos (Figura 45), lo que está de acuerdo con las observaciones de Kaiser *et al.*, (2015) y Kurze *et al.*, (2018) que mostraron que la cantidad de proteínas *Fra a 1* no estaba relacionada con el color de fruto. Sin embargo, resultados previos en transformaciones transitorias de silenciamiento por inoculación de frutos habían mostrado una falta de desarrollo de color en los frutos transformados (Muñoz *et al.*, 2010). Una posible explicación a la aparición de este fenotipo es que fuera el resultado de un efecto indirecto asociado al propio proceso de transformación transitoria, que implica un daño mecánico al fruto, además de un proceso de interacción con *Agrobacterium*. Estudios previos en frutos de fresa infiltrados usando la misma técnica han mostrado que efectivamente, el proceso de agroinfiltración *per sé* produce cambios en la expresión de algunos genes, como un aumento de expresión de la peroxidasa *POD27*, implicada en la biosíntesis de lignina (Yeh *et al.*, 2014), por lo que no se descarta que también hubiera producido cambios de expresión en genes asociados a la producción de color.

Los resultados de los estudios metabólicos realizados en los frutos con los *Fra a 1* silenciados han mostrado como resultado más relevante una diferencia entre el contenido de glutatión entre las plantas silenciadas y los controles transformados con el vector vacío, aunque no sea significativo en todas las líneas. El glutatión es un metabolito importante en plantas donde se ha mostrado que tiene diferentes funciones en el desarrollo de las mismas, incluyendo la participación en rutas biosintéticas y de detoxificación, en la actividad antioxidante, participando en la homeostasis redox y también en el transporte vacuolar (Noctor *et al.*, 2012). Su disminución en los frutos transgénicos, debido al silenciamiento de las *Fra a 1* (Figura 53), podría tener consecuencias en alguno de los posibles procesos en los que este compuesto está implicado y dar información, por tanto, de la función de estas proteínas. Los otros metabolitos que también muestran diferencias entre las transgénicas y el control son el HHDP-galoil-glc y el DMHF-glc, pero no se encontró ningún cambio transcripcional que soportara los cambios metabólicos encontrados.

Después de analizar los datos obtenidos del transcriptoma de los frutos rojos de las líneas de silenciamiento y compararlos con las líneas control transformadas con el vector vacío se obtuvieron 419 genes diferencialmente expresados, con un umbral muy restrictivo (p valor $< 0,002$), en las líneas de silenciamiento con respecto a la media de los dos controles, lo que indica que el silenciamiento de la familia *Fra a 1* está produciendo un cambio transcriptómico significativo en el fruto. Trabajos previos de silenciamiento de genes reguladores como *FaGAMYB* (Vallarino *et al.*, 2015) y *FaMADS9* (Vallarino *et al.*, 2019) en frutos rojos de fresa han resultado en la expresión diferencial de 2.600 y 1.943 genes, respectivamente. Sin embargo, los 419 encontrados para *Fra a 1* indican cambios menos generalizados y más específicos de determinados procesos biológicos. Al agrupar estos genes diferencialmente expresados en sus categorías GO se ha visto que, en cuanto a los Procesos Biológicos, la categoría donde se han producido más alteraciones es la de "Procesos de oxidación-reducción" (20 %), en cuanto a los Componentes Celulares las categorías de "Membrana" y "Componentes integrales de membrana" suman un 63 %, y con respecto a la Función Molecular las más representadas son la "Actividad oxidoreductasa" (8 %) y la de "Unión al ADN" (6 %). Estos resultados ponen de manifiesto que esta familia de

proteínas podría tener una función relacionada con procesos de oxido-reducción, quizás asociado a algún tipo de transporte.

Se ha realizado también un análisis más detallado, en el que no solo se han estudiado las categorías de los genes diferencialmente expresados, sino también de los genes que componen estas categorías mayoritarias. Lo primero que se ha observado es que hay cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis y degradación del glutatión (GSH) (Tabla 7). El GSH es un compuesto esencial en plantas con múltiples funciones, siendo una de las principales su actividad antioxidante (Noctor *et al.*, 2012). Por un lado, se ha visto que los genes codificantes de enzimas implicadas en su degradación, tal como la GGT y la GGC presentan una expresión disminuida en los frutos silenciados. Estos resultados concordarían con un aumento de GSH en los frutos silenciados, pero esto no coincide con el análisis metabólico, que muestra una disminución del contenido de GSH (Figura 53). Lo que si podría explicar esta disminución del GSH es que los genes implicados en la síntesis de los precursores del GSH, tales como la glutamina sintetasa (GS) y la GOGAT para la síntesis de Glu, y la GLS/OASTL para la síntesis de Cys, están menos expresados en los frutos silenciados que en los controles. En el caso del Glu, las isoenzimas GDH (GDH1 y GDH2) presentan menor expresión en los frutos silenciados, aunque la influencia de estas actividades en el catabolismo global del Glu es menor, teniendo en cuenta los múltiples destinos metabólicos de este aminoácido (Forde & Lea, 2007). No obstante, el análisis del contenido de estos aminoácidos, Glu y Cys, en los frutos de las líneas de silenciamiento ayudaría a explicar si el posible menor contenido en GSH en los frutos silenciados se explica por una limitación de estos aminoácidos precursores.

La aparente relación de Fra a 1 con el contenido de glutatión en los frutos de fresa se refuerza con el hecho de que, de las 67 glutatión transferasas (GSTs) que se encuentran en el genoma de *F. vesca* (Edger *et al.*, 2017), hay 9 en las líneas de silenciamiento que tienen su expresión disminuida en relación al control (Tabla 8). Las GSTs son enzimas capaces de catalizar la transferencia del tripéptido glutatión a un co-sustrato (R-X) para formar un producto S-glutationilado (R-SG), aunque también pueden tener funciones no catalíticas como la de unir flavonoides en el citosol y transportarlos a la vacuola (Dixon *et al.*, 2002, Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019). Las 9 GST diferencialmente expresadas pertenecen a las clases *Tau* (GSTU) y *Phi* (GSTF),

que contienen Ser en su centro activo. Las enzimas de estas clases pueden tanto catalizar reacciones de conjugación del GSH con diferentes metabolitos como unir ligandos, modificando su polaridad y facilitando su transporte a la vacuola (Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019). Una de las *GST* que está diferencialmente expresada, *RAP-L1* (FvH4_6g38760), que corresponde al tipo GSTF, se ha propuesto que en *F. vesca* transporta antocianinas a la vacuola en hojas y frutos, lo que es importante para el color de estos (Luo *et al.*, 2018). En *Arabidopsis*, otro miembro de la familia, la *GSTF12*, también identificado como *TRANSPARENT TESTA19* (TT19), se ha mostrado que actúa en el transporte de flavonoides a la vacuola en la hoja (Sun *et al.*, 2012). Sin embargo, en los frutos de las líneas de silenciamiento no hay diferencia en el contenido de antocianinas, ni en el color, en relación al control.

Esa unión de las GST con ligandos puede ser transitoria pues, posteriormente, se produce una unión de estos ligandos a transportadores del tipo ABC para su secuestro en la vacuola (Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019). En frutos de vid, se ha mostrado la presencia de uno de estos transportadores ABC (*VvABCC1*) que transporta antocianinas a la vacuola, siendo dependiente de GSH que es co-transportado con la antocianina (Francisco *et al.*, 2013). Sin embargo, el gen de fresa más homólogo al de la vid, el correspondiente al gen de *F. vesca* *FvH4_7g30780*, no está diferencialmente expresado en los frutos silenciados en *Fra a 1* (Anexo I). En el presente estudio, cuatro miembros de la familia de transportadores tipo ABC tienen su expresión disminuida en las líneas de silenciamiento. La búsqueda de homólogos de estos genes en otras especies no muestra información sobre la función concreta de los mismos.

Las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) forman una gran superfamilia, que es especialmente numerosa en las plantas. La mayoría están unidas a membranas y participan en procesos de transporte. Su nomenclatura ha sido difícil de unificar, pero se ha propuesto una basada en la organización del genoma humano (HUGO) (Verrier *et al.*, 2008). Así, la mayoría de las proteínas ABC de eucariotas se agrupan en 8 subfamilias (A-H). De las 4 diferencialmente expresados en los frutos de fresa silenciados, 2 pertenecen a la subfamilia B y 2 a la subfamilia G (Tabla 9). En el caso de la ABCB4/PGP4 (FvH4_4g21380) la proteína de mayor homología en *Arabidopsis* se ha mostrado que está involucrada en el transporte de auxinas (Cho *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2012). De la otra proteína de la subclase B, la ABCB3/PGP3 (FvH4_1g26280) no

hay descrita función en la correspondiente de *Arabidopsis*. En relación a los transportadores ABC de la subfamilia G se ha encontrado que están implicados en procesos de desarrollo (Do *et al.*, 2018). De los que están diferencialmente expresados en los frutos silenciados, se ha mostrado que el gen de *Arabidopsis* correspondiente al ABCG11 (FvH4_1g20390) transporta monómeros lipídicos que son importantes en la secreción epicuticular (Bird *et al.*, 2007) y en el desarrollo vascular (Le Hir *et al.*, 2013). Del otro miembro de la subfamilia, ABCG27 (FvH4_6g21010) no hay función propuesta para el homólogo de *Arabidopsis*. Todo esto, junto con el hecho de que el 63 % de los genes diferencialmente expresados en las líneas de silenciamiento están localizados en la membrana y que el transporte de membrana es el tercer proceso biológico más representado, hace pensar que la familia Fra a 1 podría tener una función relacionada con el transporte a través de membrana, aunque con estos datos no se puede discernir cuál podría ser. Algunas de las funciones conocidas de esta familia de transportadores tipo ABC en *Arabidopsis* son funciones diversas que, *a priori*, no se pueden asignar a alguno de los transportadores ABC con expresión disminuida significativamente en los frutos silenciados en *Fra a 1*.

Otra familia de proteínas de membrana, las MATE, asociadas al transporte de metabolitos secundarios, la detoxificación de xenobióticos y la resistencia a enfermedades (Upadhyay *et al.*, 2018) tiene también tres de sus miembros diferencialmente expresados en las líneas silenciadas (Tabla 10). Dos de ellos, *DTX16* y *DTX27*, sin función conocida en los homólogos de *Arabidopsis*, tienen la expresión disminuida, y el tercero, *DTX35*, aumentada. El homólogo en *Arabidopsis* de este último está relacionado con el transporte de flavonoides en células epidérmicas de las flores y en la cubierta de las semillas (Marinova *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009; Kitamura *et al.*, 2016) y como canal de Cl⁻ en el tonoplasto para mantener la turgencia celular (Zhang *et al.*, 2017). Los frutos silenciados no mostraron diferencias aparentes ni el color, ni en la turgencia, por lo que la asignación de posibles funciones a estos transportadores MATE en el transporte de antocianinas a vacuola estaría descartada.

Con los datos obtenidos del transcriptoma diferencial de los frutos silenciados en relación al control se puede especular sobre una posible función de defensa por parte de las proteínas Fra a 1. En primer lugar, la categoría de ``Respuesta de defensa`` en los términos GO representa un 4 % de los genes diferencialmente expresados, siendo un 20

% la categoría más abundante, la de ``Procesos oxidación reducción'', que está frecuentemente asociada a respuesta a estrés biótico (Lehmann *et al.*, 2015; Baxter *et al.*, 2013). Estudios previos en fresa han mostrado que *Fra a 1.02* aumenta su expresión en frutos de fresa tras la infección por *Colletotrichum* (Amiz-Ruiz *et al.*, 2016). En segundo lugar, que entre los genes diferencialmente expresados hay algunos relacionados con la síntesis, conjugación y señalización del ácido jasmónico (JA), lo que debe tener como consecuencia una alteración de los niveles de JA y sus derivados. Los jasmonatos son moléculas señalizadoras esenciales que coordinan la respuesta de las plantas a diferentes estreses bióticos y abióticos, así como a diversos procesos de desarrollo (Wasternack & Hause, 2013). En tercer lugar, que hay cinco genes que se corresponden a FTs tipo WRKY cuya expresión está disminuida en los frutos silenciados (Tabla 13), cuyos homólogos de *Arabidopsis* *WRKY23*, *WRKY28*, *WRKY33* y *WRKY48* están relacionados con la defensa frente a patógenos (Lippok *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2008; Levée *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). El *WRKY33* de *Arabidopsis* presenta homología con los genes *FvH4_6g10510* y *FvH4_3g39850* de fresa. Se sabe que *WRKY33* en *Arabidopsis* responde a estímulos asociados a la defensa frente a diferentes patógenos (Lippok *et al.*, 2007). En fresa, en tejidos de la corona de plantas infectadas con *Colletotrichum*, se ha observado un aumento significativo de la expresión de dos genes homólogos a *WRKY33* (Amil-Ruiz *et al.*, 2016), que se corresponden con los encontrados en los frutos silenciados en *Fra a 1*. Además, se ha mostrado también que la expresión de dichos genes aumenta tras el tratamiento con JA, pero no con SA (Amil-Ruiz *et al.*, 2016). En la especie silvestre, *F. vesca*, el gen correspondiente (*FvH4_6g10510*) también mostró una activación en su expresión en frutos transgénicos que sobreexpresan una pectin metil esterasa (*FaPEI*). Resulta muy interesante que estos frutos mostraran también una mayor resistencia a la infección por *Botrytis cinerea* (Osorio *et al.*, 2011). En relación al gen *FvH4_1g26980*, homólogo al gen de *Arabidopsis* *WRKY23*, se ha mostrado que el ortólogo al gen de *Arabidopsis* en álamos desempeña una función reguladora en la respuesta de defensa (Levée *et al.*, 2009). En relación al *WRKY* correspondiente al gen de *F. vesca* *FvH4_3g06200*, el posible ortólogo en *Arabidopsis*, *WRKY28*, ha sido implicado en *Arabidopsis* en la defensa frente a patógenos por la ruta JA/etileno (Chen *et al.*, 2013) y en respuestas de defensa sistémica adquirida (Timmermann *et al.*, 2019). Por último, el gen correspondiente al de *F. vesca* *FvH4_4g20230* presenta la mayor homología al

WRKY48 de *Arabidopsis*, cuya expresión también se ha asociado a la respuesta de defensa frente a patógenos (Xing *et al.*, 2008).

Por último, la actividad transcripcional de algunos *WRKY* es modulada por proteínas con motivo VQ (Jing & Lin, 2015), y una de estas proteínas de la fresa (FaVQ25) tiene su expresión disminuida en las líneas de silenciamiento. En la fresa, se ha mostrado que la expresión de esta proteína se incrementa en los frutos infectados por *Colletotrichum acutatum*, así como por el tratamiento con MeJ y SA (Garrido-Gala *et al.*, 2019). Se conoce, además, que su homólogo en *Arabidopsis* (AtVQ23) actúa como activador de *WRKY33* en respuesta a defensa (Lai *et al.*, 2011).

En resumen, tanto el análisis global de los genes diferencialmente expresados como el análisis detallado, indica que el silenciamiento de los *Fra a 1* afecta la maquinaria de respuesta a patógenos en los frutos de fresa. La determinación de saber donde se inicia la acción molecular de las proteínas *Fra a 1* necesitaría de ensayos y aproximaciones moleculares más específicas. Los estudios de interacción con ligandos de estas proteínas (Casañal *et al.*, 2013a), así como la búsqueda de interactores proteicos, que no dio resultados positivos como se indica en el capítulo anterior de la presente Memoria, deberían conducir a aclarar este punto. De cualquier forma, los estudios del transcriptoma en frutos silenciados presentados en este capítulo apuntan a que la acción de las proteínas *Fra a 1* pudiera tener lugar muy al principio de la cadena de respuesta, quizás a nivel de JA. En su acción, o previamente a ella, podría haber una alteración de la localización de determinados metabolitos y/o del estado redox intracelular que formaría parte de la acción de las proteínas *Fra a 1*.

Capítulo 5: Structural Bases for the Allergenicity of Fra a 1.02 in Strawberry Fruits

Orozco-Navarrete, B., Kaczmarska, Z., Dupeux, F., Garrido-Aranda, M., Pott, D., Diaz-Perales, A., Casañal, A., Marquez, J. A., Valpuesta, V., & Merchante, C. (2020). Structural bases for the allergenicity of Fra a 1.02 in strawberry fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.9b05714

1 Structural Bases for the Allergenicity of Fra a 1.02 in Strawberry 2 Fruits

3 Begoña Orozco-Navarrete,^{†,¶,Ⓜ} Zuzanna Kaczmarek,^{‡,§,¶,Ⓜ} Florine Dupeux,^{‡,Ⓜ} María Garrido-Arandia,[⊥]
 4 Delphine Pott,[†] Araceli Díaz Perales,[⊥] Ana Casañal,[#] José A. Márquez,[‡] Victoriano Valpuesta,^{*,†,Ⓜ}
 5 and Catharina Merchante^{*,†}

6 [†]Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM),
 7 Universidad de Málaga-CSIC, 29016 Málaga, Spain

8 [‡]European Molecular Biology Laboratory, 38042 Grenoble, France

9 [§]International Institute of Molecular and Cell Biology, 12-109 Warsaw, Poland

10 [Ⓜ]Institut de Biologie Structurale (IBS), 38000 Grenoble, France

11 [⊥]Departamento de Biotecnología-Biología vegetal, Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA),
 12 Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

13 [#]Cambridge Biomedical Campus, Francis Crick Avenue, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 0QH, England

14 **S** Supporting Information

15 **ABSTRACT:** Although strawberries are highly appreciated fruits, their intake can induce allergic reactions in atopic patients.
 16 These reactions can be due to the patient's previous sensitization to the major birch pollen allergen Bet v 1, by which IgE
 17 generated in response to Bet v 1 cross-reacts with the structurally related strawberry Fra a 1 protein family. Fra a 1.02 is the
 18 most expressed paralog in ripe strawberries and is highly allergenic. To better understand the molecular mechanisms regulating
 19 this allergic response, we have determined the three-dimensional structure of Fra a 1.02 and four site-directed mutants that were
 20 designed based on their positions in potential epitopes. Fra a 1.02 and mutants conform to the START fold. We show that the
 21 cross-reactivity of all the mutant variants to IgE from patients allergic to Bet v 1 was significantly reduced without altering the
 22 conserved structural fold, so that they could potentially be used as hypoallergenic Fra a 1 variants for the generation of vaccines
 23 against strawberry allergy in atopic patients.

24 **KEYWORDS:** *Fra a 1, Fragaria x ananassa, allergen, PR-10, IgE binding, 3D-structure, hypoallergenic mutants*

Capítulo 6: Conclusiones

1.- Using yeast two hybrid assays, we found that strawberry HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR3 (FaHSF3) could be a potential candidate to interact with *Fra a 1.01*. However, as the interaction does not occur in all tested cases, using yeast two hybrid and co-immunoprecipitation, alternative methods will be needed to confirm it.

2.- The fruits that silence *Fra a 1.02* by RNAi also show a decrease in the levels of expression of other *Fra a 1* genes. The extent of this silencing is proportional to the degree of sequence similarity shared among these *Fra a 1* genes, which, *a priori*, discards a transcriptional relationship between them.

3.- The metabolomic and transcriptomic analyses of the transgenic fruits that silence *Fra a 1.02* suggest a role of *Fra a 1* genes in the maintenance of the cellular redox status and the defense against biotic stresses, being specially important the changes related to glutathione metabolism and jasmonic acid biosynthesis and signaling. The absence of changes related to color, anthocyanin content and transcriptional levels in the enzymes of the phenylpropanoids/flavonoids pathway seems to reject the hypothesis of *Fra a 1.02* being involved in pigment biosynthesis.

4.- We have determined the three-dimensional structure of *Fra a 1.02* to a resolution of 2,04 Å. *Fra a 1.02* conforms to the START fold and shows a high structural homology to *Fra a 1.01* and *1.03*. Its hydrophobic cavity is compatible with the binding of myricetin.

5.- The *Fra a 1.02* mutants generated in this study show a decrease in their binding to the IgE generated against Bet v 1. This, combined to their structural analysis that show no major conformational changes compared to the wild type form, could make of these mutants potential candidates for the generation of new vaccines against type I strawberry allergies.

Capítulo 7: Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal empleado en el estudio han sido plantas de fresa, *Fragaria x ananassa* cv. Camarosa. Las transformaciones con las construcciones de silenciamiento (35S::*Fra a 1.02i*, EXP::*Fra a 1.02i*) y su control (el vector *pBINPLUS*), se hicieron en plantas de fresa de la misma variedad, al igual que las construcciones de sobreexpresión y su control (35S::*Fra a 1.01GFP*, 35S::*Fra a 1.02GFP* y *pGWB5*). Las plantas se encuentran en invernadero a una temperatura de 24 grados y luz natural.

También se han utilizado plantas de *N. benthamiana* para los ensayos de co-inmunoprecipitación, las plantas se crecieron en cámaras de cultivo con 16 h de luz y 8 de oscuridad a 23 °C.

Construcciones

- **Construcciones del doble híbrido**

Las genotecas de cDNA de fresas en estado verde y rojo fueron cedidas por Arnaud G. Bovy (Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Holanda). Las cedieron tanto en el vector de destino, *pDEST22*, como en *pENTR/D-TOPO*[®] (a partir de ahora *pENTR*) (ambos vectores son de Invitrogen).

Fra a 1.01, *1.02* y *1.03* fueron clonados desde *pENTR* a los vectores de destino de los diferentes sistemas de doble híbrido usados, *pDEST*[™] 32 (Invitrogen) y *pGBKT7* (Clontech), mediante una reacción LR como se describe en *Gateway*[™] LR *Clonase*[™] II *Enzyme Mix*. Una vez clonados, se transformaron células de *Escherichia coli* DH5 α y se guardaron alícuotas en glicerol 50 % a -80 °C.

Para clonar la genoteca desde el *pENTR* al plásmido *pGADT7* de Clontech se usó el protocolo *CloneMiner*[™] II *cDNA Library Construction Kit* de Invitrogen.

Para la comprobación de interacción de FaHSF3 con *Fra a 1.01* se clonó en el vector *pENTR* la región codificante de este gen, obtenida mediante amplificación por

PCR, con un programa estándar adaptado a longitud fragmento amplificado, siguiendo el protocolo *pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit*. Y una vez en *pENTR* se clonó tanto en *pDEST™32* y *pGBKT7* mediante reacción LR.

- **Construcciones para co-inmunoprecipitación**

Para la co-inmunoprecipitación se hicieron las construcciones de *GFP-FaHSF3* (en el plásmido *pGWB6*), *HA-Fra a 1.01* y *HA-Fra a 1.02* (en el plásmido *pGWB15*). Los vectores binarios *pGWB* fueron desarrollados por Nakagawa *et al.*, 2007.

- **Construcciones para localización subcelular**

Para estudiar la localización subcelular en el microscopio confocal de *Fra a 1.01*, *Fra a 1.02* y *FaHSF3* se hicieron las construcciones *GFP-FaHSF3* en el plásmido *pGWB6*, y las construcciones *RFP-Fra a 1.01* y *RFP-Fra a 1.02* en *pH7WGR2*.

- **Construcciones para las líneas transgénicas de silenciamiento**

Para generar las construcciones de silenciamiento se amplificó un fragmento de DNA de *Fra a 1.02*, de 124pb, lo más específico posible de *Fra a 1.02* con respecto al resto de *Fra a 1* teniendo en cuenta la similitud de secuencias que tienen estos genes (Figura 42). Este fragmento se insertó dos veces en un vector intermedio, *pHANNIBAL*, en direcciones opuestas, para que en su expresión forme una horquilla de doble hebra de RNA que active el proceso de silenciamiento. La construcción generada en *pHANNIBAL* se clonó posteriormente en el vector de expresión *pBINPLUS*. Para realizar estas construcciones se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran el fragmento de *Fra a 1.02* e introdujeran sitios de corte por enzimas de restricción al principio y al final de la secuencia seleccionada. Los oligonucleótidos fueron: *F2 sil.XbaI F*, *F2 sil.XhoI F*, *F2 sil.EcoRI F*, *F2 sil.HindIII R* y *F2 sil.KpnI R* (Tabla S1).

En el caso del silenciamiento bajo el promotor *35S*, primero se amplificó *Fra a 1.02* con los oligonucleótidos *F2 sil.XbaI F* - *F2 sil.HindIII* por un lado y *F2 sil.XhoI F* - *F2 sil.KpnI R* por otro lado, con el fin de obtener dos fragmentos, uno con los sitios de corte *XbaI-HindIII* y otro con los sitios de corte *XhoI-KpnI*. Estos fragmentos se clonaron en *pGEM®-T Easy*, siguiendo el protocolo descrito en *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*. Posteriormente, se cortó tanto el plásmido *pHANNIBAL* como el *pGEM-T* con el fragmento de *Fra a 1.02* con las enzimas *XbaI* y

HindIII. Se hizo una ligación con la enzima ligasa T4 (*Thermo Scientific*) siguiendo el protocolo del *Rapid Ligation KIT*. Una vez que ese fragmento ya estaba insertado en *pHANNIBAL* se repitió la operación con el fragmento que contenía los sitios de corte *XhoI-KpnI*. El siguiente paso fue sacar la región correspondiente a la horquilla de silenciamiento de *pHANNIBAL* para introducirla en *pBINPLUS*, lo que se hizo mediante digestión con *XbaI* y *XhoI* de ambos plásmidos y después se hizo una ligación. Al final se obtuvo un plásmido *pBINPLUS* con una región codificante de una horquilla de silenciamiento que incluía dos fragmentos en antisentido de *Fra a 1.02* (*35S::Fra a 1.02i*).

En el caso del silenciamiento bajo el promotor de la expansina (*EXP2*, *FvH4_7g25860*) se insertaron en *pHANNIBAL* los fragmentos de *Fra a 1.02* con los sitios de corte *F2 sil.XbaI F - F2 sil.HindIII* por un lado y *F2 sil.EcoRI F - F2 sil.KpnI R* por otro lado, igual que se hizo en el caso anterior. Pero, en este caso, antes de sacar la secuencia con los dos fragmentos de *Fra a 1.02* enfrentados se introdujo el promotor *EXP* (Nardi *et al.*, 2016) que procedía de un vector *pBINPLUS* en el que estaba insertado (Martín-Pizarro, 2019) cortando con *SacI* y *EcoRI* tanto en el *pHANNIBAL* con los dos fragmentos de *Fra a 1.02* (donde eliminó el promotor *35S*). Posteriormente, como en el caso anterior, se sacó la región correspondiente a la horquilla de silenciamiento, en este caso junto con el promotor *EXP*, mediante digestión con *XbaI* y *SacI* y se insertó en *pBINPLUS* mediante ligación, dando como resultado la construcción *EXP::Fra a 1.02i*.

Todas las construcciones se introdujeron tanto en *E. coli* (DH5 α) como en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404, Hellens *et al.*, 2000) y con ésta última fue con la que se transformaron las plantas.

- **Construcciones para las líneas transgénicas de sobreexpresión**

Para las construcciones de sobreexpresión se usó el vector *pGWB5*, tanto para *Fra a 1.01* como *Fra a 1.02*, que estaban en pENTR. Se clonaron mediante una reacción de LR siguiendo el protocolo *Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix*. Al final se obtuvieron las construcciones *35S::Fra a 1.01GFP*, *35S::Fra a 1.02GFP*. Ambas se introdujeron en *E. coli* (DH5 α) y *A. tumefaciens* (LBA4404), como en el caso del silenciamiento.

Amplificación de las genotecas de fresa y extracción de DNA para los ensayos de doble híbrido

La amplificación de las genotecas para su posterior extracción de DNA se hizo en medio Luria-Bertani (LB) – Agar con 100 µg/mL de Ampicilina para que los clones muy representados no impidieran el crecimiento de los clones poco representados, como pasaría en medio líquido. Se sembraron 15 placas de Petri de 150 mm de diámetro con una cantidad suficiente de inóculo para que crecieran muchas colonias aisladas pero que no llegara a ser un césped, se usó aproximadamente un volumen de 500 µL de cultivo congelado en glicerol 50 % en 15 mL de LB. Se obtuvieron 249.480 clones de la genoteca de fruto verde y 157.080 clones de la genoteca de fruto rojo. Las colonias fueron separadas del medio LB sólido mediante la adición de 6 ml de medio LB líquido y un asa de vidrio, y fueron recogidas para una posterior extracción de DNA.

La extracción de DNA de cada genoteca se hizo con el kit *QIAGEN® Plasmid Mini, Midi and Maxi Kit*, siguiendo el protocolo de la preparación *Maxi*, eluyendo el producto final en 500µl de tampón TE (1M Tris-HCl (pH 8), 0.1M EDTA).

Transformaciones en levaduras

La cepa de levaduras usada fue *Saccharomyces cerevisiae* PJ696: MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ que es una derivada de PJ69-4A (James *et al.*, 1996).

Las co-transformaciones de las levaduras con los plásmidos que contienen el dominio de activación y el dominio de unión fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gietz. y Schiestl (1995). Se sembraron en medio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado con diferentes aminoácidos, según la selección requerida (Medio –His –Ade +3-AT: YNB+Met+Lys+Ura+3-AT 2mM, Medio +His -Ade: YNB+Met+Lys+Ura+His, Medio –His +Ade +3-AT: YNB+Met+Lys+Ura+Ade+3-AT 2mM, Medio +His +Ade: YNB+Met+Lys+Ura+His+Ade). Todos seleccionan las levaduras co-transformadas gracias a la ausencia de triptófano y leucina.

Ensayos de doble híbrido

Se siguió el protocolo de doble híbrido *Two Hybrid System TRAF0 Protocol* (Agatep, R. *et al.*, 1998) con una escala de 20 X y se sembró cada transformación en 30 placas de 150 mm con medio selectivo +Ade -His +3-AT que se incubaron hasta 10 días a 28 °C. Al mismo tiempo, se sembraron diluciones en el medio selectivo +Ade +His para poder cuantificar la eficiencia de la transformación. Como controles del ensayo se usaron levaduras co-transformadas con los plásmidos *pGADT7-Antígeno T (AgT)*, *pGBKT7-supresor de tumores p53 (p53)* y *pGBKT7-Laminina C (LamC)*. Como control negativo se co-transformó *pGBKT7-LamC* con *pGADT7-AgT* y como control positivo se co-transformó *pGBKT7-p53* con *pGADT7-AgT* (interacciones descritas en Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual). Una vez transcurrido ese tiempo los posibles positivos que crecieron se multiplicaron en otra placa igual y se realizó una extracción de DNA, que posteriormente se introdujo en *E. coli* (DH5 α) para poder hacer el análisis de restricción, ya que la extracción de DNA de las levaduras no es tan eficiente como en *E. coli*. Los análisis de restricción se hicieron de 5 colonias de *E. coli* transformadas con el DNA procedente de una misma levadura, para comprobar si esa levadura tenía solo un clon de la genoteca o si tenía más de uno. Estos análisis se hicieron con las enzimas de restricción *SacII* y *KpnI*, que tienen sitios de corte en el plásmido *pDEST22*.

Una vez comprobado que se trataba de clones individuales, se hizo una co-transformación de cada clon aislado con el correspondiente *Fra a 1*, y también con el plásmido vacío. El objetivo era comprobar que se repetía la interacción, cuando estaba co-transformado con *Fra a 1*, y que no estaba auto activando el sistema, cuando estaba co-transformado con el plásmido vacío. En el caso de las levaduras que tenían dos plásmidos se co-transformaron ambos por separado. La co-transformación se sembró en medio +His +Ade y una vez crecidas las colonias se hicieron estriaciones en otra placa de medio +His +Ade, dos colonias por cada co-transformación. Una vez obtenida suficiente biomasa (2 o 3 días) se hicieron diluciones en placas de ELISA de 96 pocillos y se sembraron dos colonias de cada transformación con una pipeta multicanal en los 4 medios selectivos para ver si crecían en todos. Los clones que crecieron en los medios selectivos se secuenciaron.

Extracción de proteínas y detección por *western blot*

Durante este trabajo se han extraído proteínas de diferentes organismos, que son:

- **Levaduras**

Se partió de un precultivo a 30 °C durante la noche en el medio +Ade +His de levaduras recién co-transformadas con los plásmidos *pDEST32* conteniendo las diferentes construcciones de los *Fra a 1* y con *pDEST22* vacío. Este cultivo se diluyó hasta una Densidad Óptica de 600 nm (DO_{600}) de 0,2 en un volumen final de 50 mL. Cuando el cultivo llegó a la fase exponencial (DO_{600} 0,7-1) se centrifugó a 3.000 x g durante 3 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 1 mL de agua fría y posteriormente se resuspendió cada muestra en tampón RIPA con inhibidor de proteasas (2 mM de NaH_2PO_4 pH7, 0,2 % Tritón X-100, 0,02 % w/v SDS, 0,2 mM EDTA pH8, 10 mM de NaCl y 1 pastilla de *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* por cada 10 mL de tampón). Las células se añadieron a 400 μ L de *Glass beads* (425-600 μ m, SIGMA) frías y se utilizó el *FastPerp™ FP120* (BIO101) para romperlas (15 seg dos veces a 5,5 de velocidad con un descanso de 1 minuto en hielo). Posteriormente, se añadieron 400 μ L de tampón RIPA con inhibidor de proteasa y se agitaron en el *vortex* dos veces durante 5 seg, con un descanso en hielo, y se recogió el sobrenadante.

La concentración de proteínas del extracto se midió mediante el método Bradford y se cargaron unos 87 μ g de muestra en un gel desnaturizante de poliacrilamida, de 1,5 mm al 10 %, para detectar las proteínas por *western blot*.

- **Frutos de fresa**

Para la extracción de proteínas de fresas se partió de 100 mg de tejido congelado macerado en frío con nitrógeno líquido a los que se le añadieron 100 μ L de tampón Laemmli 2X y se mezcló en el *vortex* en pequeños intervalos, para que el tejido no se calentase. Una vez el tejido estuvo totalmente mezclado con el tampón se homogenizó en un sonicador (*J.P. Selecta Ultrason*) durante 10 min en agua con hielo. Transcurrido este tiempo la suspensión se hirvió a 95 °C durante 5 min y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 8 min. Una vez centrifugado se recogió el sobrenadante y se guardó a -20 °C.

Para los ensayos de *western blot* se cargaron 20 μ L de muestra en geles desnaturizante de poliacrilamida de 1 mm al 15 %.

- **Hojas de fresa**

En el caso de la extracción de proteínas de hojas se hizo igual que en fruto pero con la salvedad de que se adicionaron 300 μ L de tampón Laemmli 2X a 0,1 gr de tejido macerado y congelado.

Una vez hechas las extracciones y cargadas las proteínas en el gel, estas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (*Immobilon-P*) usando el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer* de Bio-Rad y el programa estándar de 30 min. Los anticuerpos usados para hibridar la membrana (según el caso) fueron el anticuerpo de conejo policlonal anti-Fra a 1.02 (Casañal, 2014), el anticuerpo monoclonal anti-GAL4 DNA-BD de Clontech (0,5 μ l/ml), el anticuerpo monoclonal anti-HA (Roche) y el anticuerpo monoclonal anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology).

El revelado de la membrana se hizo con el kit de revelado normal *Clarity™ Western ECL Substrate* de Bio-Rad cuando la cantidad de proteína era alta o con el kit de revelado sensible *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* de ThermoFisher cuando hizo falta más sensibilidad debido a la baja cantidad de proteína.

Extracción DNA en levaduras

Se realizó a partir de cultivos de 10 mL de levadura en estado estacionario (DO_{600} 1,3-1,8) crecidas en medio de selección +Ade +His a 30 °C. Una vez alcanzada esa densidad óptica se centrifugó el cultivo (3.000 rpm, 5 min) y se resuspendieron las células en 1 mL de tampón SP (1,2 M sorbitol, 50 mM Citrato de Sodio, 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 40mM EDTA, pH 5,6 con H_3PO_4) al que se le añadieron 40 U/mL de *liticasa* (SIGMA, L-4025). Las muestras se incubaron 2-3 h a 37 °C y se comprobó que las paredes celulares se habían lisado poniendo 2 μ L de muestra y 1 μ L de SDS 10 % en un portaobjetos y observándolo al microscopio. Una vez rotas las paredes celulares de las levaduras se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm y el precipitado se resuspendió en 500 μ L de TE 1x. Después se le añadieron 50 μ L de solución SDS 10 %, se mezcló por inversión y se incubaron 5 min a 65 °C. Una vez transcurrida la incubación se le añadieron 165 μ L de acetato potásico 5 M, y se incubó en hielo durante 30 min, tras los cuales se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se pasó a otro tubo donde se le añadieron 750 μ L de isopropanol y se incubó a -20 °C durante

10 min, tras lo cual se centrifugó 15 min a 13.000 rpm a 4 °C y se lavó el precipitado con 800 µL de etanol 70 %. Posteriormente, el precipitado se dejó secar solo unos 10 min y se resuspendió en 300 µL de TE 1x. Después añadieron 200 µL de fenol, se agitó en el *vortex* y luego se le añadieron 200 µL de cloroformo/isoamílico (24:1), se volvió a mezclar y se centrifugó 5 min a 13.000 rpm. La fase acuosa se pasó a otro tubo y se repitió el paso del cloroformo/isoamílico. Después, se pasó de nuevo la fase acuosa a un nuevo tubo y se le añadieron 20 µL de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes (500 µL) de etanol 100 %. El tubo se incubó en hielo 10-20 min y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. El precipitado se lavó con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en 25-50 µL de agua miliQ.

Agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

Se partió de un cultivo fresco de la cepa de *A. tumefaciens* (GV3101::pMP90) transformada con las proteínas de interés y se sembró en una placa con los antibióticos rifampicina 50 µg/mL y gentamicina 25 µg/mL, que corresponden a la resistencia de *A. tumefaciens* y del plásmido donde se encuentra la construcción, respectivamente.

Al día siguiente se inició el cultivo líquido con 100 mL de medio LB con los antibióticos y se incubó a 28 °C con agitación durante la noche. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron los cultivos a 4500 rpm durante 15 min y se resuspendieron en 10 mL de tampón de agroinfiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,6 y 1 mM acetosiringona). Una vez que se resuspendieron las células, se dejaron incubando 2 h a temperatura ambiente y oscuridad. Pasada la incubación, se midieron las DO₆₀₀ haciendo diluciones 1/10.

Se calcularon las cantidades necesarias para que cada construcción de la mezcla tuviera una DO₆₀₀ de 0,4 exceptuando el plásmido control con la proteína p19 (supresora del silenciamiento mediado por la planta frente a una infección, Voinnet *et al.*, 2003) que se añade a una DO₆₀₀ 0,2, dando un total de una DO₆₀₀ de 1 en un volumen final de 10 mL.

Las plantas estaban crecidas durante tres semanas en condiciones de día largo, a 24 °C, y con un 65 % de humedad. Se infiltraron dos hojas de cada planta en al menos

dos plantas. La infiltración se realizó en el envés de la hoja con una jeringa de 1 mL sin aguja, con cuidado de no dañar las hojas, pero intentando que toda la hoja quedara infiltrada.

Una vez infiltradas las plantas se crecieron durante 48 h en las mismas condiciones en las que estaban previamente a la infiltración, pero teniendo especial cuidado de que la temperatura de la cámara no sobrepasase los 26-28 °C, ya que *A. tumefaciens* no es capaz de transformar por encima de esas temperaturas.

Co-inmunoprecipitación

Se partió de 2 hojas agroinfiltradas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y después maceradas hasta que quedó un polvo fino. Se usaron 0,5 g de tejido a los que se le añadieron 1 mL de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0,2% (v/v) NP-40, 10 mM EDTA, 1 mM molibdato de sodio, 1 mM fluoruro de sodio, 10 mM DTT (ditiotreitól, añadir fresco), 0,5 mM PMSF (añadir fresco), H₂O hasta 30ml, 1 % (v/v) *protease inhibitor cocktail Sigma* (P9599, añadir fresco) por cada gramo de tejido. Se mezclaron en un rotatubos a 4 °C durante 30 min. Después se centrifugó durante 20 min a 15.000 xg a 4 °C, se filtró el sobrenadante con una columna de filtración por gravedad (*Poly-Prep Chromatography Columns #731-1550 Bio-Rad*) y se pasó el filtrado a tubos eppendorf. Se recogieron 100 µL que se guardaron como extracto crudo. Una vez hecho esto se prepararon las bolitas de agarosa anti-GFP GFP-trap (Chromotek) (de aquí en adelante ``beads``), se utilizaron 50 µL por muestra y se equilibraron con 3 lavados en 500 µL de tampón de lavado (igual que el de extracción pero sin detergente), centrifugando posteriormente a 2500 xg durante 2 min a 4 °C. Después, se distribuyó la misma cantidad de *beads* en cada muestra con puntas de micropipeta cortadas para que la apertura fuera más ancha y las *beads* pasaran fácilmente. Se incubaron las *beads* con las muestras durante 4 h a 4°C, en rotación. A partir de ese momento el resto de protocolo se hizo en cámara fría.

Una vez incubadas las *beads* con las muestras se centrifugaron 2 min a 2.000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se resuspendieron las *beads* en 500 µL de tampón de lavado. Esto se repitió 3 veces. En el último lavado se quitó el sobrenadante intentando no dejar nada de tampón y se resuspendió en 70 µL de tampón Laemmli 2X (con 2 % de

β -mercaptoetanol como agente reductor). También se añadió tampón Laemmli 2X a las muestras del extracto crudo. Tanto las muestras del extracto crudo como las de la inmunoprecipitación se mezclaron muy bien en el *vortex* y se calentaron 20 min a 70 °C. Las muestras de la inmunoprecipitación se centrifugaron a 2500 rpm y se guardó el sobrenadante. Después de esto, se cargaron unos 20 μ L de muestra en dos geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12 % para hacer un *western blot*. Las proteínas se transfirieron de los geles a dos membranas de PVDF y estas se hibridaron con anticuerpos monoclonales anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) una membrana y anti-HA (Roche) la otra.

Co-inmunoprecipitación no dirigida

Todo el protocolo se hizo en la cámara fría a 4 °C. Se partió de 10 g de tejido congelado y macerado por muestra. Se añadieron 20 mL de tampón de extracción (150 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% (v/v) NP-40, 5 mM EDTA, 10 mM molibdato de sodio, 10 mM fluoruro de sodio, 2 mM ortovanadato de sodio, 10 mM DTT (añadir fresco), 2 mM PMSF (añadir fresco), *protease inhibitor cocktail sigma* (P9599, añadir fresco)) y se dejó en rotación a 4 °C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó 20 min a 15.000 xg a 4 °C y el sobrenadante se filtró con una columna de filtración por gravedad (*Poly-Prep Chromatography Columns #731-1550* Bio-Rad). Se tomaron 100 μ L para extracto crudo, se añadieron 100 μ L de tampón Laemmli 2X y se guardaron a -20 °C. A cada muestra se le adicionaron 100 μ L de suero con el anticuerpo anti-Fra a 1.02 sin purificar, y una de las muestras se trató con suero preinmune. Se incubó en rotación durante 1 hora a 4 °C. Pasado esa incubación se le añadieron 50 μ L de *beads* anti-IgG (Rockland Trueblot®) de conejo y se incubó 1 hora a 4 °C en rotación. Después se centrifugó a 100 xg durante 30 seg, se tomaron 100 μ L del sobrenadante y el resto se desechó. Se lavó el precipitado 3 veces con 500 μ L de tampón de lavado (igual que el de extracción, pero con 0,5 % (v/v) NP-40), después del primer lavado se pasaron a tubos *ependorf*. Entre lavado y lavado se dejaron los tubos en rotación durante 5 min y se cogieron 100 μ L de sobrenadante después de cada lavado. Después se hicieron 2 lavados más sin detergente. Una vez terminados los lavados se quitó el sobrenadante con cuidado y se añadieron 50 μ L de tampón Laemmli 2X. Se calentaron las muestras 20 min a 70 °C con un paso por el *vortex*. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto, se tomó el sobrenadante y se repitió este último paso

con el tubo con las *beads* por si había quedado un poco más de sobrenadante. Después de este proceso se cargaron unos 7 μ l de muestra en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12 % para hacer un *western blot*. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF y ésta se hibridó con un anticuerpo policlonal anti-Fra a 1.02 de conejo.

Observación de muestras en microscopio confocal

Las imágenes de microscopía confocal se tomaron en un microscopio Leica TCS SP5 II, que está dotado de un láser de argón de 488nm para GFP y YFP y un láser He-Ne de 561nm para FM4-64. Posteriormente se trabajó en ellas con el software LAS AF Lite de leica. Algunas imágenes se montaron en el software ImageJ.

Transformación de las plantas

Para transformar las diferentes plantas de fresa de *F. x ananassa* cv Camarosa se siguió el protocolo descrito en El-mansouri *et al.*, 1996. Para el cultivo *in vitro* de las diferentes plantas de fresa se usó el medio N30K, que es una modificación del medio MS (Murashige y Skoog) descrito en Barceló *et al.*, 1998.

Para el cultivo de *A. tumefaciens* fue necesario hacer un pre-cultivo en 7 mL de medio LB líquido a pH 7 durante la noche a 28 °C, con el que se inoculó (con 500 μ L) el cultivo final que era de 50 mL de medio LB líquido a pH 5, suplementado con los antibióticos correspondientes y acetosiringona (50 μ g/mL). Este medio se incubó a 28 °C durante la noche y fue usado para la transformación.

Para cada transformación se usaron alrededor de 500 discos de hoja y peciolo obtenidos de plantas del stock crecidas *in vitro*. Los discos de hoja se incubaron durante una semana en oscuridad a 21 °C en placas de Petri en medio de regeneración (N30K con 0,5 μ g/mL de IBA y 2 μ g/mL de BA) con la cara adaxial de la hoja en contacto con el medio. Pasado este tiempo los discos de hoja se pusieron en contacto con el cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la construcción de interés. Para ello se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min el cultivo de *A. tumefaciens* crecido durante la noche hasta una DO a 600 nm de 0,2-0,3 y se resuspendió en 50 mL de agua estéril. En cada tubo de cultivo se introdujeron 50 discos de hoja y se incubaron en agitación durante 15 min,

con el cuidado de que no hubiera muchas burbujas alrededor de los explantos, para maximizar la superficie de explanto en contacto con el cultivo. Una vez transcurrido ese tiempo los explantos se secaron suavemente y fueron depositados de nuevo en las mismas placas de Petri en las que habían estado incubando. Posteriormente se incubaron dos días en oscuridad en la cámara de cultivo.

Transcurridos esos dos días los explantos fueron trasladados a placas Petri con medio de regeneración suplementado con kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y carbenicilina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar las células que habían sido transformadas e inhibir el crecimiento del *A. tumefaciens*. Posteriormente, se incubaron tres días más en oscuridad y después se pasaron a luz, donde estuvieron siendo subcultivados en el mismo medio cada cuatro semanas a la espera de la formación de los callos. Con el paso del tiempo se fueron formando callos y en algunos de ellos se formaron pequeños tallos. Cuando esto último ocurría se pasaron a tarros donde pudieran crecer con medio de multiplicación (N30K con 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kinetina), que contenía también kanamicina y carbenicilina. En este último medio las plántulas fueron capaces de generar raíces. Se siguieron subcultivando cada 4 semanas hasta conseguir coronas independientes. Conseguidas las líneas independientes se sub-cultivaron cada ocho semanas para que se multiplicasen y obtener más plantas idénticas de cada línea. Una vez obtenidas 5 plantas de cada línea se pasaron a tierra tres de ellas mientras que las otras dos se quedaron *in vitro* para tener una reserva. Las que se pasaron a tierra se aclimataron en cámaras de cultivos de plantas (23 °C, 16 h de luz y 8 oscuridad) durante 5 semanas y posteriormente fueron llevadas al invernadero.

Extracción de DNA genómico y comprobación de las líneas transgénicas

Para la extracción de DNA genómico se partió de tejido de hojas jóvenes, aproximadamente un tercio de hoja, que se maceró con 600 μL de tampón CTAB (10 g CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio), 1,5 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,1 M Tris pH 8, 10 g PVP (polivinilpirrolidona-40) y 0,5 % de β -mercaptoetanol (añadido en fresco)) en hielo. Una vez macerado completamente se incubó 30 min a 65 °C en movimiento. Transcurrido ese tiempo se le añadieron 600 μL de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 bajo la campana de extracción y se agitó en el *vortex* hasta obtener una emulsión blanca. Esta se centrifugó 10 min a 11.000 rpm y se transfirió el sobrenadante

(unos 450 μ L) a un nuevo tubo en el que se repitió el paso anterior, añadiendo el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (unos 450 μ L) y mezclándolo en el *vortex*. Tras centrifugar 5 min a 10.000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo se le añadieron 250 μ L (que equivale a 2/3 del volumen) de isopropanol y se mezcló por inversión hasta que apareció un precipitado blanquecino en la mayoría de los casos. Los tubos con la mezcla se incubaron 30 min a -20 °C y posteriormente se centrifugaron 15 min a 14.000 rpm. Pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μ L de etanol 70 %. Se centrifugó 5 min a 14.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente unos 10 min. Una vez el precipitado estuvo seco se resuspendieron las muestras en 100 μ L de agua miliQ y se guardaron a -20 °C.

Para la comprobación de la transformación se hicieron reacciones de PCR, con un programa estándar adaptado a longitud fragmento amplificado, con oligonucleótidos específicos de kanamicina y de los insertos. Con este objetivo, se hicieron diluciones 1/10 del extracto genómico y se usaron 2 μ L para la realización de la PCR en un volumen final de 20 μ L.

Extracción de RNA

Para extraer el RNA de los frutos de fresas se siguió un protocolo adaptado de Gambino *et al.*, 2008. Se partió de 300 mg de tejido congelado y macerado (con nitrógeno líquido) al que se le añadieron 900 μ L de tampón de extracción (2% CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), 2 M NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 2,5% PVP-40 (polivinilpirrolidona-40) y 2 % de β -mercaptoetanol (añadido en fresco) previamente precalentado a 65 °C y se mezclaron en *vortex*. Una vez bien mezclado se incubaron las muestras a 65 °C durante 10 min y transcurrido ese tiempo se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 y se mezcló en el *vortex*. Esta mezcla se centrifugó a 11.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se pasó a un nuevo tubo y se repitió la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Una vez hecho esto, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, se le añadió cloruro de litio a una concentración final de 3 M y se incubó 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a 21.000 xg durante 20 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 500 μ L de tampón SSTE (10 mM Tris-HCl

pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 % SDS, 1 M NaCl) precalentado a 65 °C. Una vez resuspendido el precipitado, se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1, se mezcló en el *vortex* y se centrifugó a 11.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se le añadieron 0,7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó inmediatamente a 21.000 xg durante 15 min a 4 °C. Pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 75 %, se secó el precipitado y se resuspendió en 30 µL de agua miliQ.

Una vez finalizada la extracción, se cuantificaron las muestras y se diluyeron para obtener un volumen final de 44 µL a una concentración de 0,2 µg/µL para hacer el tratamiento con DNAsa. A los 44 µL se le añadieron 1 µL de DNAsa I (Invitrogen) y 5 µL del tampón de la DNAsa, se incubó a 37 °C durante 30 min y se le añadió 50 µL de agua miliQ. Posteriormente, se le añadieron 100 µL de cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se mezcló en el *vortex* y se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se recogió el sobrenadante, al que se le añadieron 10 % de acetato potásico 3 M a pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío. La mezcla se incubó 30 min en hielo y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó 14.000 rpm durante 15 min. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado 10 min, tras los cuales se resuspendió en 20 µL de agua miliQ. Para comprobar que no había habido degradación del RNA durante el proceso de extracción, se cargaron en un gel de agarosa al 1 % y se visualizó con luz UV.

Preparación de las muestras para RNA-seq

Tanto para el *RNA-seq* como para el análisis metabolómico se usaron 3 lotes que contenían cinco frutos cada uno que provenían de plantas diferentes (de forma que no se repetían frutos de la misma planta en distintos lotes), de cada una de las muestras. Estas fueron: pBIN (L4) (*pBINPLUS* vacío línea 4), pBIN (L5) (*pBINPLUS* vacío línea 5), 35S::*Fra a 1.02i* (L4), 35S::*Fra a 1.02i* (L5), 35S::*Fra a 1.02i* (L6).

Las medidas de calidad del RNA y el RNA-seq se hicieron en el servicio de ultrasecuenciación en el Centro de Supercomputación y Bioinnovación-Universidad de Málaga. Primero se realizó el control de calidad de las muestras. Para medir el pico de

RNA se usó un Bioanalyzer 2100 (Agilen) (2100 Expert (B.02.08.SI648)), para medir el RNA HS se usó Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies) y para el cociente A260/280 un NanoVue *Plus* (GE healthcare).

Cuando se comprobó la calidad de las muestras se prepararon las genotecas de cDNA con un tamaño medio de longitud de fragmentos de 200-500 pb, que no presentaban más del 5 % en tamaños inferiores a 200 pb. Una vez realizadas las genotecas siguieron la estrategia de secuenciación con la configuración de carrera 2X High Output V2, 150 ciclos (2 x 75pb) con el equipo NextSeq550 (Illumina), haciendo 12 muestras por carrera.

Análisis de los datos de RNA-seq

Los datos de RNA-seq fueron analizados en el laboratorio de Ross Sozzani en la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Las lecturas fueron mapeadas sobre la última anotación del genoma de *F. vesca* (Edger *et al.*, 2018). La limpieza, conteo y normalización de las lecturas mapeadas se hicieron con los programas TopHat, Cufflinks y Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2012). El análisis estadístico de las diferencias de expresión se hizo también por Cufflinks, que valora como positiva la significatividad de la expresión diferencial si el valor de p es inferior a 0,002 después de la corrección de Benjamin-Hochberg para comparaciones múltiples (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/#differential-expression-tests>).

Para la asignación de las predicciones funcionales de los genes se utilizó Blast2go (Conesa & Gotz, 2008) aplicado a la anotación GO de los genes de *F. vesca* (Darwish *et al.*, 2015).

Análisis de metabolitos

El análisis de cromatografía líquida-ionización por electroespray-espectometríaⁿ de masa (LC-ESI-MSⁿ) lo realizó Johanna Trinkl en el laboratorio del Dr. Wilfried Schwab en la Universidad Técnica de Munich (TUM), Alemania.

Las muestras fueron congeladas y maceradas en frío hasta quedar un fino polvo. Posteriormente se liofilizaron y se usaron alícuotas de 50 mg del polvo liofilizado de

cada una de las tres réplicas biológicas de cada línea transgénica. Se añadió glucósido de 4-metilumbeliferilo (250 μ L de una solución en metanol, 0,2 mg/mL) como un estándar interno (IS), teniendo 50 μ g de IS en cada muestra. Después de añadir 250 μ L de metanol se agitó con *vortex* y se sonicó durante 10 min, tras los cuales se centrifugó a 16.000 xg durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y el precipitado fue extraído de nuevo con 500 μ L de metanol. Se combinaron ambos sobrenadantes y se concentraron en un concentrador a vacío, posteriormente se redisolviéron en 35 μ L de agua. Esto fue mezclado durante un minuto por *vortex*, se sonicó 10 min y se centrifugó 10 min a 16.000 xg, el sobrenadante fue usado para los análisis de LC-MS. Cada extracto fue inyectado dos veces (réplicas técnicas). Los metabolitos fueron identificados por sus tiempos de retención, espectros de masas y espectros de iones de producto en comparación con los datos determinados para material de referencia auténtico. Los ésteres de glucosa de fenilpropanoides fueron sintetizados enzimáticamente con FaGT2 (*Fragaria x ananassa* glucosiltransferasa 2) (Lunkenbein *et al.*, 2006). Los compuestos pelargonidina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-glucurónido, quercetina 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucurónido, kaempferol 3-O-glucósido, catequina y epicatequina se obtuvieron de *Roth*, Karlsruhe, Alemania. Las proantocianidinas y pelargonidina 3-O-glucósido-6-O-malonato se aislaron de fresa y se identificaron de acuerdo con Fossen *et al.*, (2004).

El análisis de los metabolitos se realizó como está descrito en Fischer *et al.*, 2014, usando un espectrómetro de masas de trampa de iones *Bruker Daltonics esquire 3000_{plus}* (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemania) conectado con un sistema *Agilent 1100 HPLC* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba cuaternaria y un detector de díodos. Los componentes se separaron con una columna *Phenomenex Luna C-18* (150mm de largo y 2.0 mm de diámetro interior y tamaño de partículas de 5 μ m (*Phenomenex*, Aschaffenburg, Alemania) a una temperatura de 28 °C. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se hizo con el siguiente sistema de gradiente binario: solvente A (agua con 0,1 % de ácido fórmico), solvente B (metanol 100 % con 0,1 % de ácido fórmico). El programa de gradiente fue el siguiente: en los primeros 30 min se pasó de 100 % de A hasta 50 % de A y 50 % de B, posteriormente, en 5 min se cambió de 50 % de A y 50 % de B hasta 100 % de B, esto se mantuvo 15 min, después se pasó de 100 % de B a 100 % de A en 5 min y esto se mantuvo 10 min. La tasa de flujo fue de 0,2 mL/minuto. Los parámetros de ionización

fueron 4.000 V en el capilar y -500 V en la placa. La salida del capilar fue 121 V y la amplitud del Octopolo RF fue 150 Vpp (voltaje pico a pico). La temperatura del gas seco (N₂) fue 330 °C a un caudal de 9 L/min. El barrido completo de los espectros de masa se midió a 50-800 m/z hasta que el ICC objetivo llegó a 20.000 o 200 ms. Espectrometrías de masa en tándem fueron llevadas a cabo usando helio como gas de colisión (3,56 x 10⁻⁶ mbar) con un voltaje de colisión de 1 V. El espectro de masas se adquirieron en modo de ionización negativa y positiva. El autotandem de espectrometría de masa se usó para descomponer los iones [M + H]⁺, [M - H]⁻ o [M + HCOO]⁻ más abundantes de los diferentes compuestos.

Los principales metabolitos fenólicos se cuantificaron en el modo MS positivo (antocianinas) y negativo (fenilpropanoides y flavonoides) por el método IS y se expresaron como tanto por mil (‰) de equivalentes de peso seco asumiendo un factor de respuesta de 1. Las concentraciones de metabolitos no siempre estuvieron dentro del rango lineal del detector y el cálculo de sus niveles relativos no permitió una comparación inmediata con los niveles absolutos de fenólicos proporcionados por otros estudios, pero el método ofreció la ventaja de obtener valores relativos en un corto periodo de tiempo, que es suficiente para comparar los niveles relativos de metabolitos. Las señales de los compuestos se integraron en sus trazas iónicas [M + H]⁺, [M - H]⁻ o [M + HCOO]⁻. El 4 metilumbeliferil glucósido se usó como IS para la cuantificación relativa de los metabolitos. Además, este compuesto sirvió como control para el rendimiento de ionización del espectrómetro de masas y la reproducibilidad de los tiempos de retención. Los valores se expresan en mg/kg equivalente de 4 metilumbeliferil glucósido (peso seco). La cuantificación relativa del metabolito se realizó con el software *DataAnalysis 3.1* y *QuantAnalysis 1.5* (Bruker Daltonics), normalizando todos los resultados al IS.

La cuantificación de ácido ascórbico se realizó con el reflectómetro *RQflex® 10 Reflectoquant®* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con el protocolo descrito por Pantelidis *et al.*, (2007) con pequeñas modificaciones. Las muestras de fruta de 200 mg se mezclaron con 200 mL de ácido oxálico (1 %), se homogeneizaron durante 1 minuto y se centrifugaron durante 3 min a 1.500 xg. Se recogieron 2,5 mL del sobrenadante y se mezclaron con 2,5 mL de ácido oxálico (1 %), posteriormente se suplementaron con 250 mg de polivinilpolipirrolidona (PVP) para eliminar los fenoles y

tres gotas de H₂SO₄ (25 %) para reducir el pH ≤ 1. Los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por 100 mL de sobrenadante suplementado con PVP y ácido sulfúrico.

Los datos de todos los metabolitos se expresaron en mg/kg (ppm), se hicieron las medias de las réplicas técnicas y se hicieron análisis de ANOVA de una vía con las réplicas biológicas de cada línea transgénica para ver si con un p valor de < 0,05 había diferencias significativas entre las diferentes líneas. Una vez hecho esto, se realizó un test de múltiples comparaciones de Tukey para comparar de dos a dos las diferentes líneas y ver cuales eran estadísticamente significativas y cuales no.

Summary

Chapter 1: Introduction

Strawberry (*Fragaria x ananassa*) is a fruit highly valued for its flavor, aroma and benefits for human health, therefore it has an important commercial value. In 2017, according to data from the FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 9.2 million tons of strawberries were grown worldwide, being Spain the sixth country and the first in Europe strawberries producer, with 360,416 tons. In contrast, the molecular basis of the strawberry fruit ripening process is still largely unknown.

Rosaceae family, *Fragaria* genus

The strawberry belongs to the Rosaceae family, and within this family it is included in the *Fragaria* genus, in which there are species from diploid to decaploid, being octoploid the cultivated species. A characteristic of this genus is that the true fruits are the achenes, which are found on the surface of the receptacle to which they are connected. The receptacle, where the achenes are found, is the result of the thickening of the floral receptacle, and are more diverse in different species, also having variations even within the same species (Liston *et al.*, 2014). The receptacle is composed of an internal medulla, a cortex, vascular bundles and the epidermis. The achenes are connected to the inside of the receptacle by fibrovascular strands through which nutrients reach these and the surrounding parenchymal cells (Fait *et al.*, 2008).

Geographically, the *Fragaria* genus is widespread and it is found in habitats with great differences in temperature and altitude (Johnson *et al.*, 2014), which implies that they have a great genetic variability in terms of tolerance to different climatic factors, as to pathogen resistance (Hancock & Luby, 1993). Another characteristic of this genus is clonal growth, which provides a survival advantage in certain growth conditions (Liston *et al.*, 2014).

Since the first publication of the genome of *Fragaria vesca* (Shulaev *et al.*, 2011), much progress has been made in genomic and transcriptomic studies in the

different species of the *Fragaria* genus (Kang *et al.*, 2013; Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017).

Fragaria x ananassa

The present work has been carried out in *Fragaria x ananassa*, which is the strawberry species most commercialized. It is an octoploid organism that comes from the hybridization of two octoploid species (*Fragaria virginiana* and *Fragaria chiloensis*) that occurred about 300 years ago (Edger *et al.*, 2019).

During ripening, the fruit goes through stages where its color, size and composition change. During fruit ripening there is an increase in the receptacle of soluble solids, a production of aroma and flavor compounds and alterations in fruit size, shape, texture and pigmentation (Aharoni & O'Connell, 2002).

Hormonal control of strawberry fruit ripening

Strawberry is a non-climacteric fruit, since the beginning of its ripening is not determined by an increase in respiration and a peak in ethylene production. Its maturation is mainly determined by the auxin / abscisic acid balance (ABA) (Perkins-Veazie, 1995; Jia *et al.*, 2011). However, other hormones such as ethylene, gibberellins, cytokinin and jasmonic acid have been proposed to be involved in specific ripening-associated processes in the receptacle (Gu *et al.*, 2019).

Fra a 1 family of proteins

This PhD Thesis focuses on the study of the Fra a 1 family of proteins of *F. x ananassa*, which belongs to the superfamily of pathogenesis-related proteins (PR-10). The families of this protein superfamily are usually multigenic (Fernandes *et al.*, 2013), and the same goes for Fra a 1 in strawberry. In *F. ananassa* the sequences deposited in the GenBank of genes of the *Fra a 1* family correspond to eight genes, *Fra a 1.01-Fra a 1.08* (Besbes *et al.*, 2019), with some allelic variants (Ishibashi *et al.*, 2018). The transcripts of each of the eight genes have been quantified by RNA-seq (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2017). In the receptacle it was observed that *Fra a 1.01* and *Fra a 1.02* show the highest levels of expression, with *Fra a 1.01* highly expressed in green fruits and decreasing with ripening, while *Fra a 1.02* expression increasing during ripening, with a maximum in red fruits. In the case of achenes, the *Fra a 1* genes also show a relatively high

expression, displaying *Fra a 1.01* and *Fra a 1.03* the highest expression, with maxima in the white and intermediate stages, respectively.

- **Function of Fra a 1 proteins**

The role of Fra a 1 proteins was initially associated to colour development in the fruits due to the absence these proteins in white varieties, however, its function is still unknown, beyond their membership in the PR10 family of proteins, generally associated with the response to pathogens.

Recently, it has been published that some Fra a 1 proteins have RNase activity, depending on their phosphorylation status (Besbes *et al.*, 2019). This RNase activity is proposed to be related to a possible function in defense against pathogens, such as has been found in other PR-10 proteins.

- **Structural characteristics**

The structure of PR-10 proteins is conserved and consists of three α helices and seven antiparallel β strands, forming a hydrophobic cavity capable of binding ligands, which could be related to their still unknown molecular function (Fernandes *et al.*, 2013). Fra a 1.01, Fra a 1.02 and Fra a 1.03 have the ability to bind flavonoids, with different selectivity and with an affinity in the μM range (Casañal *et al.*, 2013). Fra a 1.01 binds quercetin-3-O-glucuronide, Fra a 1.02 myricetin and Fra a 1.03 (+) - catechin.

The resolved structures of Fra a 1.01 and Fra a 1.03 have also been obtained, the latter linked to catechin (Casañal *et al.*, 2013). The two structures show high structural homology with PR-10 proteins (Fernandes *et al.*, 2013).

In a PR-10 protein such as the ABA receptor, PYL2, a conformational change occurs when binding to its ligand, ABA, which makes possible the binding of the interacting protein, phosphatase type 2C (PP2C) (Melcher *et al.*, 2009). These interactions are critical for its molecular function in the plant. Since Fra a 1 proteins show a high structural similarity with one of the ABA receptors of the PYR/PYL/RCAR family (Casañal *et al.*, 2013), the same interactions pattern could be

expected for Fra a 1 proteins. Therefore, one of the aims of the PhD project was to search for possible interactor proteins.

- **Gene silencing**

Generation of mutants is a good strategy to decipher the function of a gene, and it has been frequently used in model species. However, in the octoploid cultivated strawberry is not realistic, being a workable alternative the gene silencing using the *Agrobacterium* system. Thus, the generation of stable transgenic lines silencing by RNAi *Fra a 1.01* and *Fra 1.02* was main task of the PhD project, in order to obtain valuable information on the role played by these proteins in the ripening process of the strawberry fruits.

- **Allergenicity**

The existence of a hypersensitivity to strawberry fruits consumption by humans has been reported. This effect has been explained by cross-reactivity with antibodies developed against the Bet v 1 protein, the main allergen of birch pollen (Valenta & Kraft, 1996). The Bet v 1 protein also belongs to the PR10 family, and presents high structural similarity to Fra a 1 proteins (Casañal *et al.*, 2013). Thus, the ability to recognize different Fra a 1 proteins by serum IgE present in patients allergic to Bet v 1 has been evaluated (Ishibashi *et al.*, 2018). Maximum reactivity occurred with Fra a 1.01, although there was also cross reactivity with Fra a 1.02 and Fra a 1.03. However, Fra a 1.02 is the most abundant in red fruit, so it would be the main responsible for strawberry allergy in countries where people is allergic to birch pollen (Bet v 1). Some epitopes have been identified in the Bet v 1-IgE interactions (Mirza *et al.*, 2000). Therefore, we aimed in the PhD project to crystalize Fra a 1.02 and generate point mutants of the putative corresponding epitopes in this protein, when compared with Bet v 1, in order to evaluate their recognition by the sera of patients allergic to Bet v 1.

Chapter 2: Aims

Main objective: To know the function that Fra a 1 proteins, in general, and Fra a 1.02, in particular, play in strawberry fruit ripening.

This objective is intended to be achieved through the following specific objectives:

1.- Find the possible protein interactors of the Fra a 1.01 and Fra a 1.02 proteins that could give information about the molecular action and function of these proteins in the strawberry fruit.

The results obtained in the execution of this objective are set out in Chapter 3.

2.- Know the role of Fra a 1.02 in strawberry fruit by generating transgenic strawberry lines that silence this gene, and the subsequent phenotyping, metabolic, and transcriptomic analysis.

The results obtained in the execution of this objective are set out in Chapter 4.

3.- Determine the structure of Fra a 1.02 to analyze its structural differences with the other Fra a 1 mostly expressed in fruits, Fra a 1.01 and Fra a 1.03.

4.- Determination of the epitopes responsible for the allergenic response to Fra a 1.02 due to an initial allergy to Bet v 1.

The results obtained in the execution of objectives 3 and 4 are set out in Chapter 5.

Chapter 3: Interactor protein search for Fra a 1

Taking into account the structural similarity of Fra a 1 proteins with the ABA receptor, the binding capacity of Fra a 1 proteins to ligands present in the strawberry fruit, as well as the structural similarity of Fra a 1.03 bound to catechin with the closed conformation in the PYR/PYL-ABA junction, it might be hypothesized that the molecular activity of Fra 1 proteins would be mediated by its binding to a ligand and an effector protein. This was carried out through yeast two hybrid system and non-directed co-immunoprecipitation.

Search for the Fra a 1 interactor protein by Yeast Two Hybrid

The yeast two hybrid is an effective *in vivo* technique to search for protein interactions (Koegl *et al.*, 2008). In this study, libraries of cDNA of strawberry fruits at green and red stages were used in the search of interactors for Fra a 1.01 and Fra a 1.02, the two most abundant proteins in green and red fruits, respectively. Two yeast two hybrid systems have been used, Invitrogen and Clontech. The yeast strain used, *Saccharomyces cerevisiae* PJ696, where the adenine and histidine synthesis genes are used as indicators. Thus all yeasts co-transformed with yeast two hybrid plasmids *pDEST32* and *pDEST22* will grow in the + His + Ade medium, but only those in which a protein interaction occurs will grow in medium –His + Ade + 3AT, and if this interaction is strong, yeasts will grow in the medium + His -Ade and in the medium – His –Ade + 3AT.

- **Self-activation and toxicity check for Fra a 1 in yeasts**

The first was to check if the Fra a 1 proteins expressed from the plasmids were toxic to the yeast, or if they were able to self-activate the yeast two hybrid system by themselves, without the presence of any interactor. Expression tests of Fra a 1 proteins in the yeast were also made by western blots with the polyclonal anti-Gal4-BD antibody. These analyzes were done on the two yeast two hybrid systems used, Clontech and Invitrogen. These tests gave positive results, with Fra a 1 proteins expressing in the yeast, that were not toxic and did not self-activate the double hybrid system. The expression was higher in the plasmid of the Clontech system than in the Invitrogen system.

- **Co-transformations of Fra a 1 with the libraries**

A total of 1.8×10^6 clones were screened in the green fruit library and Fra a 1.01 combination, and a total of 3.1×10^6 clones in the case of the red fruit library and Fra a 1.02.

- **Co-transformations using the Invitrogen system**

A first screening with Fra a 1.02 and the red fruit library, two plasmids were found, which were named as recombinant 1 (R1) and recombinant 2 (R2). However, it was found that they were self-activating the system, as they were able to grow in the selective medium -His + Ade + 3AT when they were transforming together with the empty AD plasmid, but they were not able to grow in the more selective media, the -His -Ade + 3AT and + His -Ade. When analyzing their sequences it was shown that they were not plasmids *pDEST22*, but others of yeasts, and contained a fragment of EYFP (Yellow Fluorescent Protein) of a pYFP Star integration vector (GenBank: KJ411637.1). In addition, each had a different clone between its attB1 and attB2 sites, being FBP1 (GenBank: X81852) in the case of R1 and FBP2 (GenBank: M91666.1) in that of R2. Both genes correspond to transcription factors of *Petunia x hybrid*. Therefore, it was concluded that they were contamination in the library.

After checking the remaining positive plasmids, it was found one that shared 99% homology with a *Heat Shock Transcription Factor Protein 3 (HSF3)* from *Fragaria x ananassa* cultivating Toyonoka (GenBank: KX497002.1). Since the positive plasmid included part of the 3'-UTR and 5'-UTR regions of the gene, a new construct was prepared with only the coding region, which was tested directly with the *Fra a 1.01* and *Fra a 1.02* clones in the two hybrid system and the interaction was not repeated.

- **Co-transformations using the Clontech system**

The cloning and screening was repeated using the yeast two hybrid system of Clontech, in which the protein expression of the Fra a 1 proteins was higher. In the co-transformations made with Fra a 1.01 and the green fruit library about one million clones were screened and 35 possible positives were obtained. And, in the co-transformations made with Fra a 1.02 and the red fruit library, about two million clones were looked at and 27 possible positives were obtained. All these possible positives

were checked by following the corresponding steps without success. In this system, when the interaction of *Fra a 1.01* or *Fra a 1.02* with *HSF3* was tested the results were positive only in 60 percent of the colonies.

Search for the interactor protein by non-directed co-immunoprecipitation

With the absence of clear results by the yeast two hybrid technique, other alternatives were considered to find a possible interactor of the *Fra a 1* proteins. Two of them based on immunoprecipitation of the possible complex *Fra a 1*-Interactor were assayed. They are commonly named as indirect and direct immunoprecipitations.

- **Indirect**

To do this, an extract of strawberry proteins was incubated with a solution of rabbit anti-*Fra a 1.02* antibodies. Then, the extract was in contact with an anti-IgG resin, to fix the anti-*Fra a 1.02* - *Fra a 1* complex to whom the possible interactor would be attached. The final elution would allow to identify the proteins of the triple complex. The results were not positive, and would probably need some preliminary titration of the anti-*Fra a 1.02* antibodies, because the *Fra a 1.02* protein was not fixed to the anti-IgG resin.

- **Direct**

Due to the difficulty of binding the anti-*Fra a 1.02* to the resin in indirect immunoprecipitation it was used a direct technique where *Fra a 1* fused to GFP joined directly to an anti-GFP resin (Smits & Vermeulen, 2016). Transgenic plants of *F. ananassa* cv. Camarosa overexpressing *Fra a 1.01* and *Fra a 1.02* fused to GFP were made in order to also increase the amount of *Fra a 1* in the plant.

Finally, due to the weak expression of the fusion proteins found through western blotting in the global of all overexpression lines, these transgenic lines have not been used for immunoprecipitation, since a quantity of *Fra a 1.02*-FGP protein required cannot be obtained on those lines.

Discussion

The reason for making a search for a possible *Fra a 1*-interactor protein was the hypothesis that the molecular activity of these proteins would follow a similar pattern to that of the ABA receptor, which has a high structural similarity to the *Fra a 1* proteins.

The interactions to form the complex ABA-receptor-PP2C trigger the signalling cascade of this hormone (Melcher *et al.*, 2009). Since natural ligands have been identified for Fra a 1.01 and Fra a 1.02 (Casañal *et al.*, 2013) the occurrence of a interacting protein was a possibility to be addressed.

At the end of the experiments, we scrutinized an elevated number of clones from both libraries prepared from green and red fruits, that should be sufficient to consider that a high percentage of native proteins have been checked. The cDNA libraries were not normalized, this means that some genes are more represented than others. Probably, the preparation of normalized libraries is an option to increase the efficiency of the system with low expressed genes, as somehow expected for those encoding for signalling proteins. Another option is to consider the possibility of performing the yeast two hybrid assay in the presence of the Fra a 1 ligands. In the case of ABA receptor is known that the binding of the ligand (ABA) to its receptor facilitates the binding of the interacting protein PP2C (Melcher *et al.*, 2009).

There was a possible positive that interacted with Fra a 1.01, HSF3, but the one to one interaction assays was confirmed only in a limited number (around 60% with the Clontech system). So directed co-immunoprecipitations were done to verify this interaction, but the results were inconclusive because the negative controls did not work as expected. In parallel, the cellular location of HSF3 and Fra a 1.01 was checked thanks to the fusion of HSF3 to GFP and Fra a 1.01 to RFP. Both fusion proteins were located in the nucleus, cytoplasm and/or membrane. However, since there were not clear positive results of the yeast two hybrid interaction or co-immunoprecipitation, this result of co-location has no value, being only a necessary condition.

With the absence of results by the yeast two hybrid technique, other alternatives were considered to find the possible Fra a 1 interactor protein. One of these techniques was non-directed co-immunoprecipitation, both direct and indirect.

The result of non-direct co-immunoprecipitation with Fra a 1.02 and the fruit extract was not positive. The presence of Fra a 1.02 was not detected attached to the anti-IgG column. Somehow, the expected IgG/anti-Fra a 1.02 interactions, or Fra a 1.02/anti-Fra a 1.02 did not occur.

As for direct co-immunoprecipitation, the problem was that overexpression plants did not produce the fusion protein, something that was detected by western blotting, or produced them in such a small amount that the experiments were not feasible. The failure of overexpression of Fra a 1 proteins bound to GFP is unknown, perhaps a system of post-transcriptional/translational regulation by the plant is active.

After all these attempts to search for an interactor of Fra a 1 proteins there were not definitive positive results. However, given the variety of available techniques for these weak interactions and that, in principle, the starting hypothesis is not ruled out, the project deserves to make some future investment.

Chapter 4: Changes produced by the silencing of *Fra a 1.02* in fruits

In order to know the function of the *Fra a 1.02* protein, transgenic plants silenced in *Fra a 1.02* were generated, and phenotypic, metabolomic and transcriptomic studies were carried out.

Characterization of transgenic plants

Transgenic plants silenced in *Fra a 1.02* were generated using RNAi constructs under the control of the *35S* promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV35S) or the expansin promoter (*EXP2*, *FvH4_7g25860*). The expression of *FaEXP2* is fruit specific and increases as fruit ripening progresses, being in red fruit where it has the highest expression (Nardi *et al.*, 2016).

The silencing of *Fra a 1.02* in the transgenic lines was verified by *western blot* of fruit extracts. Not only *Fra a 1.02* was not detected, but also other *Fra a 1* proteins of the fruit were absent in the silenced fruits.

Two control lines (pBIN (L4) and pBIN (L5)), generated after transformation with the empty vector, and three transgenic lines (35S :: *Fra a 1.02i* (L4), 35S :: *Fra a 1.02i* (L5) and 35S :: *Fra a 1.02i* were selected (L6)) to perform the characterization. First to indicate that none of the transgenic lines showed an apparent different phenotype to the controls.

The metabolic analysis was restricted to following families of compounds: flavonoids, flavanoids, derivatives of ellagic acid, phenylpropanoids, glutathione, and others such as citric acid, malic acid, ascorbic acid, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H) -furanone-glucoside and phenylalanine.

In this analysis the concentrations of different metabolites in fruits of the silenced lines have been studied and compared with the controls. It has been seen that there are differences of any of the metabolites tested between the muted lines and the controls, but those differences were not statistically significant.

In relation to the transcriptional analysis, the first thing that was studied was the level of silencing of the different *Fra a 1* genes, and it was found that *Fra a 1.02*, *Fra a 1.04*, *Fra a 1.05* and *Fra a 1.06* were silenced at a value greater than 90 %, while *Fra a 1.01*, *Fra a 1.03*, *Fra a 1.07* were silenced around 50 % and, finally, the silencing of the *Fra a 1.08* was 22.1 %. These values are in accordance with the level of homology among the genes of the family.

The analysis of the differential expression of all genes showed that there were 419 differentially expressed genes (DE genes) between the transgenic lines and the control, when using a threshold level for p value of 0,002. The analysis of the DE genes in relation to their gene ontology (GO) categories grouped them by Biological Processes, Cellular Components and Molecular Functions. The most represented categories within Biological Processes are "Oxidation-reduction processes" (20 %) and "Metabolic processes" (11 %). In the Cellular Components the most represented terms were the "Membrane" and the "Internal membrane components", representing 37 % and 26 % respectively. And finally, in the relation to Molecular Function, the most represented are "Oxidoreductase activity" (8 %) and "DNA binding" (6 %).

Afterwards, a more detailed analysis of the genes that fall within the major categories was performed.

In relation to the glutathione (GSH) content, genes corresponding to the enzymes involved in the glutathione degradation such as γ -glutamyl transpeptidase (GGT) and one of the two γ -glutamyl cyclotransferase (GGC) showed a significant decrease in their expression in the silenced lines. On the other hand, genes corresponding to the synthesis of the precursor amino acids of GSH such as the gene encoding Cys synthase (OASTL) showed a decreased expression in the silenced lines, as well as the glutamine synthetase (GS1) and Glu synthase (GLS) genes / GOGAT).

Glutathione transferases (GST) are enzymes that catalyse the transfer of GSH to a co-substrate (RX) to form a polar reaction product S-glutathylate (R-SG). Among the DE genes it was found that a total of nine GSTs were differentially expressed in the fruits of the silenced lines in relation to the control. In all cases, the expression was lower in the silenced fruits.

Membranes were the GO category most represented within the Cellular Components among the DE genes, and transmembrane transport was the third GO category most represented in Biological Processes. The presence of different families of transporters among the DE genes showed that four members of the ABC type transporter family showed a significant decrease in their expression level in the silenced fruits with respect to the controls.

Among the DE genes it was also found the presence of members of other families of membrane proteins, as the Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), also known as Detoxification Efflux Carrier (DTX) proteins. Three members of this family were among the DE genes, two of them have a lower expression and the other older, with respect to the controls.

The GO category of Defense Response is another of the most represented category among the DE genes. Thus, a number of genes related to jasmonic acid (JA) biosynthesis, conjugation, and signalling were found in the DE genes. These genes, according to their homology with *Arabidopsis*, are 13-LOX4, 13-LOX2, AOS, AOC4, OPR3, OPR2, OPR1, JMT and MES1.

The Regulation of Transcription is another of the Biological Processes most represented in the GO categories of the differentially expressed genes. Among the genes included in this category are those that encode Transcription Factors (TF). One of the most represented families is the WRKY genes. All of them have a diminished expression in the silenced fruits *in Fra a 1*. These genes, according to their homology with *Arabidopsis*, are TIF10A/JAZ1, TIFYSA/JAZ8, GL3/GLABRA and YABBY2.

Discussion

The molecular function of Fra a 1 proteins is unknown to date, for this reason it was thought to generate transgenic strawberry plants that silence the Fra a 1.02 protein, which is the most abundant in red fruit (Muñoz *et al.*, 2010), in order to have a functional test that threw some clue about its function.

Given the great homology that this family of proteins presents among its different members, the silencing was not only given in *Fra a 1.02* but other members of the family were also silenced, at different degrees, in agreement with the level of homology to *Fra a 1.02*. This rules out the possibility that the decrease in the expression of all *Fra a 1* genes is due to some type of transcriptional interaction between them and *Fra a 1.02*, but rather it is the result of the great homology among the members of the *Fra a 1* family.

The analysis of the data obtained from the transcriptome of the red fruits of the silencing lines and its comparison with the control lines, showed that 419 differentially expressed genes were obtained, in the silencing lines with respect to the average of the two controls, which indicates that the silencing of the *Fra a 1* family is producing a significant transcriptomic change in the fruit. When grouping these differentially expressed genes according to their GO categories, the results show that this family of proteins could have a function related to oxide-reduction processes, perhaps associated with some type of transport.

A detailed analysis of the DE genes reveals that there are significant changes in the expression of genes related to the synthesis and degradation of glutathione (GSH). Thus, genes encoding for enzymes involved in their degradation, such as GGT and GGC have a diminished expression in silenced fruits. These results do not coincide with the metabolic analysis, which shows a decrease in the content of GSH. However, genes involved in the synthesis of GSH precursors, such as glutamine synthetase (GS) and GOGAT for Glu synthesis, and GLS/OASTL for Cys synthesis, are clearly under-expressed in the silenced fruits in relation to control.

The apparent relationship of *Fra a 1* with glutathione content in strawberry fruits is reinforced by the fact that of the 9 of the 67 glutathione transferases (GSTs) found in the *F. vesca* genome (Edger *et al.*, 2017) have their expression diminished in relation to the control. GSTs are enzymes capable of catalyzing the transfer of the glutathione tripeptide to a co-substrate (RX) to form an S-glutathylated product (R-SG), although they can also have non-catalytic functions such as binding flavonoids in the cytosol and transporting them to the vacuole (Dixon *et al.*, 2002, Sylvestre-Gonon *et al.*, 2019).

Another of the categories most represented in the GO is the membrane. Four members of the ABC type transporter family have their expression diminished in the silencing lines. Another family of membrane proteins, MATEs, associated with secondary metabolite transport, xenobiotic detoxification and disease resistance (Upadhyay *et al.*, 2018) also has three of its members differentially expressed in muted lines. Two of them have diminished expression, and the third one increased. The homologue in *Arabidopsis* of the latter is related to the transport of flavonoids in flower epidermal cells and in the cover of the seeds (Marinova *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009; Kitamura *et al.*, 2016) and as a Cl-channel in the tonoplast to maintain cell turgidity (Zhang *et al.*, 2017). This, together with the fact that 63 % of the differentially expressed genes in the silencing lines are located in the membrane and that the Membrane Transport is the third most represented Biological Process in the DE genes, suggests that the *Fra a 1* family could be, either directly or indirectly, involved in membrane transport processes.

With the data obtained from the differential transcriptome of the silenced fruits in relation to the control, it is possible to speculate on a possible defense function by *Fra a 1* proteins. First, the category of "Defense response" in terms GO represents 4 % of the differentially expressed genes, with the most abundant category being "Reduction oxidation processes", which is frequently associated with a response to biotic stress (Lehmann *et al.*, 2015; Baxter *et al.*, 2013). Moreover, previous studies in strawberry have shown that *Fra a 1.02* increases its expression in fruits after *Colletotrichum* infection (Amiz-Ruiz *et al.*, 2016). Secondly, that among the differentially expressed genes there are some related to the synthesis, conjugation and signaling of jasmonic acid (JA), which should result in an alteration of the levels of JA and its derivatives. This hormone plays a key role in defence response of plants. Third, that there are five genes that correspond to WRKY-type FTs whose expression is decreased in silenced fruits, whose counterparts in *Arabidopsis* *AtWRKY23*, *AtWRKY28*, *AtWRKY33* and *AtWRKY48* are related to pathogen defense (Lippok *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2008; Levée *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). In addition, it has also been shown that the expression of these genes increases after treatment with JA, but not with SA (Amil-Ruiz *et al.*, 2016). Furthermore, the transcriptional activity of some WRKY is modulated by proteins with VQ motif (Jing & Lin, 2015), and one of these strawberry proteins of this family (FaVQ25) has a diminished expression in the silencing lines. In strawberry, it

has been shown that the expression of this protein is increased in infected fruits *Colletotrichum acutatum*, as well as by treatment with MeJ and SA (Garrido-Gala *et al.*, 2019). It is also known that its counterpart in *Arabidopsis* (AtVQ23) acts as an activator of *AtWRKY33* in response to defense (Lai *et al.*, 2011).

In summary, both the global analysis of differentially expressed genes and the detailed analysis indicate that the silencing of *Fra a 1* might affect the pathogen response machinery in strawberry fruits. The determination of the specific molecular action where *Fra a 1* proteins initiate the changes here observed would require additional molecular tests and approaches. Interaction studies with ligands of these proteins (Casañal *et al.*, 2013), as well as the search for interacting proteins, which did not give positive results as indicated in another chapter of this report, could be a first step to clarify this point. However, studies of the transcriptome in silenced fruits presented in this part suggest that the action of *Fra a 1* could take place very early in the response chain, perhaps at the JA level. In this action, or prior to it, there could be an alteration of the location of certain metabolites and/or the intracellular redox state, which would be part of the action of *Fra a 1*.

Chapter 5: Structural basis for the allergenicity of Fra a 1.02 in strawberry fruits

Introduction

Strawberry consumption may produce an allergic response in atopic patients, as occurs with other species in the *Rosaceae* family (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995; Scheurer *et al.*, 1997). This is caused by the presence of three families of allergens Fra a 1, Fra a 3 and Fra a 4. Fra a 1 affects the population of central and northern Europe (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016). This allergy is caused by the recognition of Bet v 1 antibodies in previously sensitized individuals, cross recognition of the antibodies is produced by the structural homology presented by Fra a 1 and Bet v 1 (Valenta *et al.*, 1996). Through analysis of the binding properties of recombinant IgE proteins of patients allergic to Bet v 1, Fra a 1.01 has been shown to have the highest binding capacity, followed by Fra a 1.02 (Ishibashi *et al.*, 2018). While in the basophil activation trials, Fra a 1.02 has been identified as the most allergen (Franz-Oberdorf *et al.*, 2016). The knowledge of the three-dimensional structure of the protein as well as the position of the epitopes can contribute to the identification of hypoallergenic isoforms. The three-dimensional structure of Bet v 1 in contact with a mouse IgG is known (Mirza *et al.*, 2000), which has contributed to the generation of hypoallergenic isoforms of Bet v 1 by directed mutagenesis (Spangfort *et al.*, 2003).

The three-dimensional structure of Fra a 1.01 and Fra a 1.03 is known (Casañal *et al.*, 2013a; Casañal *et al.*, 2013b), but not that of Fra a 1.02 which is the most abundant in red fruit and seems to be the most relevant in the allergy to strawberry fruits. Point mutants of Fra a 1.02 have been generated at different possible IgG recognition sites to study the change in their allergenicity and structure with respect to Fra a 1.02.

Results and discussion

- **Crystallization and structural characterization of Fra a 1.02**

Fra was crystallized at 1.02 with a resolution of 2.04 Å thanks to the microseeding method in which crystals of the Fra a 1.02 mutant A141F were used. This mutant, whose structure we already had, was used as a model to obtain the initial phases

of the structure by the molecular replacement method. The resulting structure of Fra a 1.02 corresponds to the STAR folding characteristics, which are preserved in the PR-10 family (Fernandes *et al.*, 2013). It consists of three alpha helices, the largest ($\alpha 3$) at the C-terminal end and the two smallest ($\alpha 1$ and 2) consecutive near the N-terminal end, and seven anti-parallel beta strands ($\beta 1-7$). The helices and beta sheets are connected by 9 loops. All this produces an internal hydrophobic cavity, which in the case of Fra a 1.02 has 3 entrances ($\epsilon 1-3$).

The structural overlap reveals a great similarity with Fra a 1.01 and Fra a 1.03, only some conformational changes can be seen in certain areas such as in the $\alpha 3$ helix and in the loops that are close to the cavity entrance, especially in loop 5 which is the most flexible and because of that it can be thought that it acts as a door to the cavity as it happens in the ABA receptor (Santiago *et al.*, 2009) and that it is important in the recognition of the ligand.

Loop 4, which has been shown to be important as an epitope in Bet v 1 and other allergens (Son *et al.*, 1999; Spangfort *et al.*, 2003; Neudecker *et al.*, 2003), is very similar between the three Fra a 1.

- ***In silico* docking studies of myricetin and Fra a 1.02**

Myricetin is described as the ligand of Fra a 1.02 by ITC experiments, with a Kd of 19.5 μM and a stoichiometry of 1:1 (Casañal *et al.*, 2013a). To check if the catechin fits in the cavity of Fra a 1.02, it was analyzed by Induced Fit Docking (Schrödinger, 2016). The structure of Fra a 1.03 linked to catechin (PDB: 4C94) was taken as a model, since it has an 81.13% similarity with Fra to 1.02 and myricetin is structurally similar to catechin. The results indicate that myricetin has a similar position but a little turned inside the cavity with respect to the catechin. The bind would be strengthened by the hydrophobic interactions of Ala27, Ile57, Lau144, Val39 and Lys140.

- **Rational design of Fra a 1.02 variants with reduced allergenic potential through structure-based analysis.**

To identify potentially allergenic residues of Fra a 1.02, its structure has been compared with the structure of Bet v 1 attached to the FAB fragment of IgG (BV16) (PDB: 1FSK (Mirza *et al.*, 2000; Spangfort *et al.*, 2003)) and based on that we have

generated mutants, by site-directed mutagenesis, that appear to be important in the recognition of IgG. The mutants were E46R, D48R, E46A/D48A. The first two amino acids, 46 and 48, have been replaced by arginine, which being a large amino acid could prevent the binding of IgG, and the double mutant have been replaced by alanine where the small non-polar side chain could also prevent IgG binding. Two other mutants have also been generated outside Loop 4. The Q64W in Loop 5, where the tryptophan, an amino acid with a large side chain, at the entrance of the cavity could prevent binding to the ligand and affect the conformation of Loop 5. Finally, the mutant A141F in the $\alpha 3$ helix that could also prevent the entry of the ligand into the cavity, due to the size of the phenylalanine side chain.

- **The IgE-binding capacity of the structure-based Fra a 1.02 mutant variants is reduced compared to that of the wild type protein**

To study the possible variation of the IgG recognition capacity of the Fra a 1.02 mutants, ELISA experiments were performed with serum from patients allergic to Bet v 1 and it was observed that all mutants had a significant reduction of 30-40% of IgE binding generated against Bet v 1, which is in the same range of binding capacity reduction as observed in the mutant E45S of Bet v 1 (Spangfort *et al.*, 2003).

To study this, we also addressed in IgE-inhibition assays using the same pool of sera, the mutants showed a significant reduction in the IgE inhibition between 55 and 80%, compared to that of the wild type, set as 100%.

- **The overall fold of the Fra a 1.02 mutant variants is not affected**

Protein crystals of D48R, E46A/D48A and Q64W were obtained which diffracted to 1.97, 2.19 and 2.27 Å respectively. The structures were resulted by the molecular replacement method using Fra a 1.02 A141F as the initial model. The mutations do not alter the overall structure of the protein.

The reduction of IgE binding to mutants makes them potential candidates for strawberry allergy vaccines, as has been seen with Bet v 1 mutants (Spangfort *et al.*, 2003, Holm *et al.*, 2004). It could contribute to the development of safer treatments for allergies such as strawberry.

Chapter 7: Conclusions

1.- Using yeast two hybrid assays, we found that HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR3 (HSF3) could be a potential candidate to interact with Fra a 1.01. However, as the interaction does not occur in all tested cases, alternative methods will be needed to confirm it.

2.- The fruits that silence *Fra a 1.02* by RNAi also show a decrease in the levels of expression of other *Fra a 1* genes. The extent of this silencing is proportional to the degree of sequence similarity shared among these *Fra a 1* genes, which, *a priori*, discards a transcriptional relationship between them.

3.- The metabolomic and transcriptomic analyses of the transgenic fruits that silence *Fra a 1.02* suggest a role of *Fra a 1* genes in the maintenance of the cellular redox stage and the defense against biotic stresses, being specially important the changes related to glutathione metabolism and jasmonic acid biosynthesis and signaling. The absence of changes related to color, anthocyanin content and transcriptional levels in the enzymes of the phenylpropanoids/flavonoids pathway seems to reject the hypothesis of *Fra a 1.02* being involved in pigment biosynthesis.

4.- We have determined the three-dimensional structure of Fra a 1.02 to a resolution of 2,04 Å. Fra a 1.02 conforms to the START fold and shows a high structural homology to Fra a 1.01 and 1.03. Its hydrophobic cavity is compatible with the binding of myricetin.

5.- The Fra a 1.02 mutants generated in this study show a decrease in their binding to the IgE generated against Bet v 1. This, combined to their structural analysis that show no major conformational changes compared to the wild type form, could make of these mutants potential candidates for the generation of new vaccines against type I strawberry allergies.

Referencias

- Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4032-4040.
- Aaby, K., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(11), 4395-4406.
- Agatep, R., R.D. Kirkpatrick, D.L. Parchaliuk, R.A. Woods, and R.D. Gietz (1998) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol.
- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A. S., Liedl, K. R., & Tollinger, M. (2017). Structure of the major apple allergen Mal d 1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(8), 1606-1612.
- Aharoni, A., & O'Connell, A. P. (2002). Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of experimental botany*, 53(377), 2073-2087.
- Alm, R., Ekefjård, A., Krogh, M., Häkkinen, J., & Emanuelsson, C. (2007). Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *Journal of proteome research*, 6(8), 3011-3020.
- Amil-Ruiz, F., Garrido-Gala, J., Gadea, J., Blanco-Portales, R., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., de los Santos, B., Arroyo, F. T., Aguado-Puig, A., Romero, F., Mercado, J. Á, Pliego-Alfaro, F., Muñoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2016). Partial activation of SA-and JA-defensive pathways in strawberry upon *Colletotrichum acutatum* interaction. *Frontiers in plant science*, 7, 1036.

- Barceló, M., El-Mansouri, I., Mercado, J. A., Quesada, M. A., & Alfaro, F. P. (1998). Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant cell, tissue and organ culture*, 54(1), 29-36.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2013). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1229-1240.
- Besbes, F., Franz-Oberdorf, K., & Schwab, W. (2019). Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins. *Journal of plant physiology*, 233, 1-11.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., & Samuels, L. (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The plant journal*, 52(3), 485-498.
- Boter, M., Golz, J. F., Giménez-Ibañez, S., Fernandez-Barbero, G., Franco-Zorrilla, J. M., & Solano, R. (2015). FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate. *The plant cell*, 27(11), 3160-3174.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonrhein, C., & Womack, T. O. (2016). BUSTER (Global Phasing Ltd., Cambridge, UK). *Version XYZ*.
- Casañal, A., Zander, U., Muñoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M. A., Schwab, W., Valpuesta, V. & Marquez, J. A. (2013a). The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *Journal of biological chemistry*, 288(49), 35322-35332.
- Casanal, A., Zander, U., Dupeux, F., Valpuesta, V., & Marquez, J. A. (2013b). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin. *Acta Crystallographica section F: Structural biology and crystallization communications*, 69(5), 510-514.

- Casañal, A. (2014). *The Fra Allergens and their Role in the Control of Flavonoid Biosynthesis in Strawberry Plants* (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, España.

- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 66(1), 12-21.

- Chen, X., Liu, J., Lin, G., Wang, A., Wang, Z., & Lu, G. (2013). Overexpression of AtWRKY28 and AtWRKY75 in Arabidopsis enhances resistance to oxalic acid and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant cell reports*, 32(10), 1589-1599.

- Chen, S. Y., Tang, Y. M., Hu, Y. Y., Wang, Y., Sun, B., Wang, X. R., Tang, H. R., & Chen, Q. (2018). FaTT12-1, a multidrug and toxin extrusion (MATE) member involved in proanthocyanidin transport in strawberry fruits. *Scientia horticulturae*, 231, 158-165.

- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current opinion in plant biology*, 33, 147-156.

- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2018). An OPR3-independent pathway uses 4, 5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature chemical biology*, 14(2), 171.

- Cho, M., Lee, S. H., & Cho, H. T. (2007). P-Glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *The plant cell*, 19(12), 3930-3943.

- Cho, M., Lee, Z. W., & Cho, H. T. (2012). ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant physiology*, 159(2), 642-654.

- Cipriani, F., Röwer, M., Landret, C., Zander, U., Felisaz, F., & Márquez, J. A. (2012). CrystalDirect: a new method for automated crystal harvesting based on laser-induced photoablation of thin films. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 68(10), 1393-1399.
- Clancy, M. A., Rosli, H. G., Chamala, S., Barbazuk, W. B., Civello, P. M., & Folta, K. M. (2013). Validation of reference transcripts in strawberry (*Fragaria* spp.). *Molecular genetics and genomics*, 288(12), 671-681.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, 2008.
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J. R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M., Fernie, A. R., Rathjen, J. P., Botella, M. A., Valpuesta, V. & Medina - Escobar, N. (2011). Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist*, 191(2), 376-390.
- Darwish, O., Shahan, R., Liu, Z., Slovin, J. P., & Alkharouf, N. W. (2015). Re-annotation of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) genome. *BMC genomics*, 16(1), 29.
- Dimasi, N., Flot, D., Dupeux, F., & Márquez, J. A. (2007). Expression, crystallization and X-ray data collection from microcrystals of the extracellular domain of the human inhibitory receptor expressed on myeloid cells IREM-1. *Acta crystallographica section F: Structural biology and crystallization communications*, 63(3), 204-208.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome biology*, 3(3), reviews3004-1.
- Do, T. H. T., Martinoia, E., & Lee, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current opinion in plant biology*, 41, 32-38.
- Dong, J., Chen, C., & Chen, Z. (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant molecular biology*, 51(1), 21-37.

- Dong, S., Lau, V., Song, R., Ierullo, M., Esteban, E., Wu, Y., Sivieng, T., Nahal, H., Gaudinier, A., Pasha, A., Oughtred, R., Dolinski, K., Tyers, M., Brady, S. M., Grene, R., Usadel, B., & Provart, N. J. (2019). Proteome-wide, structure-based prediction of protein-protein interactions/new molecular interactions viewer. *Plant physiology*, 179(4), 1893-1907.

- Dotto, M. C., Martínez, G. A., & Civello, P. M. (2006). Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant physiology and biochemistry*, 44(5-6), 301-307.

- Dümmler, A., Lawrence, A. M., & De Marco, A. (2005). Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in E. coli using a modular set of vectors. *Microbial cell factories*, 4(1), 34.

- Edger, P. P., VanBuren, R., Colle, M., Poorten, T. J., Wai, C. M., Niederhuth, C. E., Alger, E. I., Ou, S., Acharya, C. B., Wang, J., Callow, P., McKain, M. R., Shi, J., Collier, C., Xiong, Z., Mower, J. P., Slovin, J. P., Hytönen, T., Jiang, N., Childs, K. L. & Knap, S. J. & (2017). Single-molecule sequencing and optical mapping yields an improved genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with chromosome-scale contiguity. *Gigascience*, 7(2), gix124.

- Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., Smith, R. D., Teresi, S. J., Nelson, A. D. L., Wai, C. M., Alger, E. I., Bird, K. A., Yocca, A. E., Pumplin, N., Ou, S., Ben-Zvi, G., Brodt, A., Baruch, K., Swale, T., Shiue, L., Acharya, C. B., Cole, G. S., Mower, J. P., Childs, K. L., Jiang, N., Lyons, E., Freeling, M., Puzey, J. R. & Knapp, S. J. (2019). Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature genetics*, 51(3), 541-547.

- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Valpuesta, V., López-Aranda, J. M., Pliego-Alfaro, F., & Quesada, M. A. (1996). Shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant cell reports*, 15(8), 642-646.

- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 60(12), 2126-2132.

- Eriksson, N. E., Moller, C., Werner, S., Magnusson, J., Bengtsson, U., & Zolubas, M. (2004). Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania and Russia. *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, 14(1), 70-79.

- Estrada-Johnson, E., Csukasi, F., Pizarro, C. M., Vallarino, J. G., Kiryakova, Y., Vioque, A., Merchante, A., Brumos, J., Medina-Escobar, N., Botella, M. A., Alonso, J. M., Fernie, A. R., Sánchez-Sevilla, J. F., Osorio, S., & Valpuesta, V (2017). Transcriptomic analysis in strawberry fruits reveals active auxin biosynthesis and signaling in the receptacle. *Frontiers in plant science*, 8, 889.

- Fait, A., Hanhineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V. J., Fernie, A. R., & Aharoni, A. (2008). Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant physiology*, 148(2), 730-750.

- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., & Jaskolski, M. (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS journal*, 280(5), 1169-1199.

- Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H. J., & Ebner, C. (1996). Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *Journal of experimental medicine*, 183(2), 599-609.

- Ferreira, F., Ebner, C., Kramer, B., Casari, G., Briza, P., Kungl, A. J., Grimm, R., Jahn-Schmid, B., Breiteneder, H., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H. J., & Scheiner, O. (1998). Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *The FASEB journal*, 12(2), 231-242.

- Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245.

- Fischer, T. C., Mirbeth, B., Rentsch, J., Sutter, C., Ring, L., Flachowsky, H., Habegger, R., Hoffmann, T., Hanke, M. V., & Schwab, W. (2014). Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *New phytologist*, 201(2), 440-451.

- Forde, B. G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of experimental botany*, 58(9), 2339-2358.

- Forlani, S., Masiero, S., & Mizzotti, C. (2019). Fruit ripening: the role of hormones, cell wall modifications, and their relationship with pathogens. *Journal of experimental botany*, 70(11), 2993-3006.

- Fossen, T., Rayyan, S., & Andersen, Ø. M. (2004). Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, 65(10), 1421-1428.

- Francisco, R. M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B. J., Bassin, B., Eisenach, C., Zarrouk, O., Vialet, S., Marlin, T., Chaves, M. M., Martinoia, E., & Nagy, R. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *The plant cell*, 25(5), 1840-1854.

- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Hücherig, S., Besbes, F., Darsow, U., Ring, J. & Schwab, W. (2016). Fra a 1.02 is the most potent isoform of the Bet v 1-like allergen in strawberry fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(18), 3688-3696.

- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Bleicher, P., Kurze, E., Helm, D., Olbricht, K., Darsow, U., Ring, J. & Schwab, W. (2017). White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food research international*, 100, 748-756.

- Franz - Oberdorf, K., Langer, A., Strasser, R., Isono, E., Ranftl, Q. L., Wunschel, C., & Schwab, W. (2017). Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP: Interaction of Fra a 1 proteins and FaAP. *Proteins: Structure, function, and bioinformatics*, 85(10), 1891-1901.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis*, 19(6), 520-525.
- Gansser, D., Latza, S., & Berger, R. G. (1997). Methyl jasmonates in developing strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch. Cv. Kent). *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(7), 2477-2480.
- Garrido-Gala, J., Higuera, J. J., Muñoz-Blanco, J., Amil-Ruiz, F., & Caballero, J. L. (2019). The VQ motif-containing proteins in the diploid and octoploid strawberry. *Scientific reports*, 9(1), 4942.
- Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparri, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B. & Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & function*, 6(5), 1386-1398.
- Gieras, A., Cejka, P., Blatt, K., Focke-Tejkl, M., Linhart, B., Flicker, S., Stoecklinger, A., Marth, K., Drescher, A., Thalhamer, J., Valent, P., Majdic, O., Valenta, R. (2011). Mapping of conformational IgE epitopes with peptide-specific monoclonal antibodies reveals simultaneous binding of different IgE antibodies to a surface patch on the major birch pollen allergen, Bet v 1. *The journal of immunology*, 186(9), 5333-5344.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (1995). Transforming Yeast with DNA. *Methods in molecular and cellular biology*. 5:255-269.
- Gu, T., Jia, S., Huang, X., Wang, L., Fu, W., Huo, G., Gan, L., Ding, J., & Li, Y. (2019). Transcriptome and hormone analyses provide insights into hormonal regulation in strawberry ripening. *Planta*, 250(1), 145-162.

- Guo, J., Wang, S., Yu, X., Dong, R., Li, Y., Mei, X., & Shen, Y. (2018). Polyamines regulate strawberry fruit ripening by abscisic acid, auxin, and ethylene. *Plant physiology*, 177(1), 339-351.

- Häkkinen, S. H., & Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food research international*, 33(6), 517-524.

- Halbwirth, H., Puhl, I., Haas, U., Jezik, K., Treutter, D., & Stich, K. (2006). Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(4), 1479-1485.

- Hancock, J. F., & Luby, J. J. (1993). Genetic resources at our doorstep: the wild strawberries. *BioScience*, 43(3), 141-147.

- Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical focus: a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in plant science*, 5(10), 446-451.

- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research*, 16(15), 7351-7367.

- Hirakawa, H., Shirasawa, K., Kosugi, S., Tashiro, K., Nakayama, S., Yamada, M., Kohara, M., Watanabe, A., Kishida, Y., Fujishiro, T., Tsuruoka, H., Minami, C., Sasamoto, S., Kato, M., Nanri, K., Komaki, A., Yanagi, T., Guoxin, Q., Maeda, F., Ishikawa, M., Kuhara, S., Sato, S., Tabata, S., & Isobe, S. N. (2014). Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA research*, 21(2), 169-181.

- Hjernø, K., Alm, R., Canbäck, B., Matthiesen, R., Trajkovski, K., Björk, L., Roepstorff, P. & Emanuelsson, C. (2006). Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics*, 6(5), 1574-1587.

- Hofer, H., Asam, C., Hauser, M., Nagl, B., Laimer, J., Himly, M., Briza, P., Ebner, C., Lang, R., Hawranek, T., Bohle, B., Lackner, P., Ferreira, F., & Wallner, M. (2017). Tackling Bet v 1 and associated food allergies with a single hybrid protein. *Journal of Allergy and clinical immunology*, 140(2), 525-533.

- Holm, J., Gajhede, M., Ferreras, M., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J. N., Lund, L., Jacobi, H., Millner, A., Würtzen, P. A., & Spangfort, M. D. (2004). Allergy vaccine engineering: epitope modulation of recombinant Bet v 1 reduces IgE binding but retains protein folding pattern for induction of protective blocking-antibody responses. *The journal of immunology*, 173(8), 5258-5267.

- Ilari, A., Franceschini, S., Bonamore, A., Arengi, F., Botta, B., Macone, A., Pasquo, A., Bellucci, L. & Boffi, A. (2009). Structural basis of enzymatic (S)-norcoclaurine biosynthesis. *Journal of biological chemistry*, 284(2), 897-904.

- Ishibashi, M., Nabe, T., Nitta, Y., Tsuruta, H., Iduhara, M., & Uno, Y. (2018). Analysis of major paralogs encoding the Fra a 1 allergen based on their organ-specificity in *Fragaria* × *ananassa*. *Plant cell reports*, 37(3), 411-424.

- Jahn-Schmid, B., Radakovics, A., Lüttkopf, D., Scheurer, S., Vieths, S., Ebner, C., & Bohle, B. (2005). Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 116(1), 213-219.

- Jewell, G. G., Rantsios, A., & Scholey, J. (1973). Factors influencing the breakdown of fruit in strawberry jam. *Journal of texture studies*, 4(3), 363-370.

- 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(1), 188-199.

- Jing, Y., & Lin, R. (2015). The VQ motif-containing protein family of plant-specific transcriptional regulators. *Plant physiology*, 169(1), 371-378.

- Johnson, A. L., Govindarajulu, R., & Ashman, T. L. (2014). Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of variation in breeding system, ploidy and species age. *Botanical journal of the linnean society*, 176(1), 99-114.

- Jung, S., Lee, T., Cheng, C. H., Buble, K., Zheng, P., Yu, J., Humann, J., Ficklin, S. P., Gasic, K., Scott, K., Frank, M., Ru, S., Hough, H., Evans, K., Peace, C., Olmstead, M., DeVetter, L. W., McFerson, J., Coe, M., Wegrzyn, J. L., Staton, M. E., Abbott, A. G. & Main, D. (2018). 15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1137-D1145.

- Kaiser, R., Mageney, V., Schwefel, K., Vollmers, D., Krüger, A., & Horn, R. (2016). Genotyping of red and white fruited strawberry (*Fragaria L.*) accessions and hybrids based on microsatellite markers and on the genetic diversity in the allergen genes fra a 1 and fra a 3. *Genetic resources and crop evolution*, 63(7), 1203-1217.

- 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(6), 1960-1978.

- Karlsson, A. L., Alm, R., Ekstrand, B., Fjellkner - Modig, S., Schiött, Å., Bengtsson, U., Björk, L., Hjernø, K., Roepstorff, P., & Emanuelsson, C. S. (2004). Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE - binding proteins and presumptive allergens. *Allergy*, 59(12), 1277-1284.

- Kitamura, S., Oono, Y., & Narumi, I. (2016). Arabidopsis *pab1*, a mutant with reduced anthocyanins in immature seeds from banyuls, harbors a mutation in the MATE transporter FFT. *Plant molecular biology*, 90(1-2), 7-18.

- Koegl, M., & Uetz, P. (2008). Improving yeast two-hybrid screening systems. *Briefings in functional genomics and proteomics*, 6(4), 302-312.

- Kosar, M., Kafkas, E., Paydas, S., & Baser, K. H. C. (2004). Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1586-1589.
- Kurze, E., Kock, V., Lo Scalzo, R., Olbricht, K., & Schwab, W. (2018). Effect of the strawberry genotype, cultivation and processing on the Fra a 1 allergen content. *Nutrients*, 10(7), 857.
- Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J. Q., & Chen, Z. (2011). Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *The plant cell*, 23(10), 3824-3841.
- Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A., & Rouhier, N. (2014). The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Frontiers in pharmacology*, 5, 192.
- Lalonde, S., Ehrhardt, D. W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S. Y., & Frommer, W. B. (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *The plant journal*, 53(4), 610-635.
- Laver, W. G., Air, G. M., Webster, R. G., & Smith-Gill, S. J. (1990). Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell*, 61(4), 553-556.
- Le Hir, R., Sorin, C., Chakraborti, D., Moritz, T., Schaller, H., Tellier, F., Robert, S., Morin, H., Bako, L., & Bellini, C. (2013). ABCG 9, ABCG 11 and ABCG 14 ABC transporters are required for vascular development in Arabidopsis. *The plant journal*, 76(5), 811-824.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., & Metraux, J. P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, 112, 54-62.

- Levée, V., Major, I., Levasseur, C., Tremblay, L., MacKay, J., & Séguin, A. (2009). Expression profiling and functional analysis of Populus WRKY23 reveals a regulatory role in defense. *New phytologist*, 184(1), 48-70.
- Li, Y., Pi, M., Gao, Q., Liu, Z., & Kang, C. (2019). Updated annotation of the wild strawberry *Fragaria vesca* V4 genome. *Horticulture research*, 6:61.
- Liao, W. Y., Lin, L. F., Jheng, J. L., Wang, C. C., Yang, J. H., & Chou, M. L. (2016). Identification of heat shock transcription factor genes involved in thermotolerance of octoploid cultivated strawberry. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2130.
- Liao, X., Li, M., Liu, B., Yan, M., Yu, X., Zi, H., Liu, R. & Yamamuro, C. (2018). Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. *Proceedings of the national academy of sciences*, 115(49), E11542-E11550.
- Lin, J. S., & Lai, E. M. (2017). Protein–protein interactions: yeast two-hybrid system. In *Bacterial Protein Secretion Systems* (pp. 177-187). Humana Press, New York, NY.
- 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.
- Liston, A., Wei, N., Tennessen, J., Li, J., Dong, M., & Ashman, T. L. (2019). Revisiting the Origin of the Octoploid Strawberry. *BioRxiv*, 665216.
- Lippok, B., Birkenbihl, R. P., Rivory, G., Brümmer, J., Schmelzer, E., Logemann, E., & Somssich, I. E. (2007). Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen-or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(4), 420-429.

- Liu, L., Wei, J., Zhang, M., Zhang, L., Li, C., & Wang, Q. (2012). Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. *Journal of experimental botany*, 63(16), 5751-5761.

- Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E. M., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A., Muñoz-Blanco, J., & Schwab, W. (2006). Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose: cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant physiology*, 140(3), 1047-1058.

- Luo, H., Dai, C., Li, Y., Feng, J., Liu, Z., & Kang, C. (2018). Reduced Anthocyanins in Petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry. *Journal of experimental botany*, 69(10), 2595-2608.

- Ma, S., Sicherer, S. H., & Nowak-Wegrzyn, A. (2003). A survey on the management of pollen-food allergy syndrome in allergy practices. *Journal of allergy and clinical immunology*, 112(4), 784-788.

- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.

- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*.

- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J. M., Debeaujon, I., & Klein, M. (2007). The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *The plant cell*, 19(6), 2023-2038.

- Márquez, J. A., & Cipriani, F. (2014). CrystalDirect™: A Novel Approach for Automated Crystal Harvesting Based on Photoablation of Thin Films. In *Structural genomics* (pp. 197-203). Humana Press, Totowa, NJ.

- Martín-Pizarro, C. (2019). *Identification and functional characterization of transcription factors involved in flower development and fruit ripening in Fragaria × ananassa* (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, España.

- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., & Storoni, L. C. (2007). PHASER crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*

- Medina-Mínguez, J.J., Enamorado, L.M., Navarro, C.S., Gómez-Mora, J.A. (2017). Distribución Varietal en el cultivo de Fresa en Huelva. Campaña 2016-2017. *Consejería de agricultura, pesca y desarrollo rural, instituto de investigación y formación agraria y pesquera, Junta de Andalucía*, 1-8 p.

- Medina-Puche, L., Blanco-Portales, R., Molina-Hidalgo, F. J., Cumplido-Laso, G., García-Caparrós, N., Moyano-Cañete, E., Caballero-Repullo, J. L., Muñoz-Blanco, J., & Rodríguez-Franco, A. (2016). Extensive transcriptomic studies on the roles played by abscisic acid and auxins in the development and ripening of strawberry fruits. *Functional & integrative genomics*, 16(6), 671-692.

- Melcher, K., Ng, L. M., Zhou, X. E., Soon, F. F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., Park, S. Y., Weiner, J. J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F. C., Jensen, D. R., Yong, E. L., Volkman, B. F., Cutler, S. R., Zhu, J. K. & Xu, H. E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 462(7273), 602.

- Merchante, C., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2013). Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current opinion in plant biology*, 16(5), 554-560.

- Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J. N., Wissenbach, M., Spangfort, M. D., & Gajhede, M. (2000). Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *The journal of immunology*, 165(1), 331-338.

- Muñoz, C., Hoffmann, T., Escobar, N. M., Ludemann, F., Botella, M. A., Valpuesta, V., & Schwab, W. (2010). The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 113-124.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 53(3), 240-255.
- Mutschlechner, S., Egger, M., Briza, P., Wallner, M., Lackner, P., Karle, A., Vogt, A. B., Fischer, G. F., Bohle, B., & Ferreira, F. (2010). Naturally processed T cell-activating peptides of the major birch pollen allergen. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(3), 711-718.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., & Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(1), 34-41.
- Nardi, C. F., Villarreal, N. M., Dotto, M. C., Ariza, M. T., Vallarino, J. G., Martinez, G. A., Valpuesta, V., & Civello, P. M. (2016). Influence of plant growth regulators on Expansin2 expression in strawberry fruit. Cloning and functional analysis of FaEXP2 promoter region. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 17-28.
- Neudecker, P., Lehmann, K., Nerkamp, J., Haase, T., Wangorsch, A., Fötisch, K., Hoffmann, S., Rösch, P., Vieths, S., & Scheurer, S. (2003). Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochemical journal*, 376(1), 97-107.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez - Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454-484.

- Osorio, S., Bombarely, A., Giavalisco, P., Usadel, B., Stephens, C., Aragüez, I., Medina-Escobar, N., Botella, M. A., Fernie, A. R., & Valpuesta, V. (2011). Demethylation of oligogalacturonides by FaPE1 in the fruits of the wild strawberry *Fragaria vesca* triggers metabolic and transcriptional changes associated with defence and development of the fruit. *Journal of experimental botany*, 62(8), 2855-2873.

- Pandey, S. P., & Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology*, 150(4), 1648-1655.

- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food chemistry*, 102(3), 777-783.

- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provar, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F. & Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324(5930), 1068-1071.

- Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R., & Olías, J. M. (1997). Effect of methyl jasmonate on in vitro strawberry ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(10), 3733-3737.

- Perkins - Veazie, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural reviews*, 17, 267-297.

- Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G. C., Immink, R. G. H., & Schmid, M. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, 503(7476), 414.

- Preuß, A., Augustin, C., Figueroa, C. R., Hoffmann, T., Valpuesta, V., Sevilla, J. F., & Schwab, W. (2014). Expression of a functional jasmonic acid carboxyl

methyltransferase is negatively correlated with strawberry fruit development. *Journal of plant physiology*, 171(15), 1315-1324.

- PyMOL. (2017). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.

- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The plant cell*, 23(5), 1795-1814.

- Qiao, Q., Xue, L., Wang, Q., Sun, H., Zhong, Y., Huang, J., Lei, J. & Zhang, T. (2016). Comparative transcriptomics of strawberries (*Fragaria* spp.) provides insights into evolutionary patterns. *Frontiers in plant science*, 7, 1839.

- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research*, 42(W1), W320-W324.

- Roulias, A., Pichler, U., Hauser, M., Himly, M., Hofer, H., Lackner, P., Ebner, C., Briza, P., Bohle, B., Egger, M., Wallner, M., & Ferreira, F. (2014). Differences in the intrinsic immunogenicity and allergenicity of B et v 1 and related food allergens revealed by site - directed mutagenesis. *Allergy*, 69(2), 208-215.

- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J. & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2479.

- Sánchez-Sevilla, J. F., Vallarino, J. G., Osorio, S., Bombarely, A., Posé, D., Merchante, C., Botella, M. A. & Valpuesta, V. (2017). Gene expression atlas of fruit ripening and transcriptome assembly from RNA-seq data in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Scientific reports*, 7(1), 13737.

- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., & Márquez, J. A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, *462*(7273), 665.
- Sarojam, R., Sappl, P. G., Goldshmidt, A., Efroni, I., Floyd, S. K., Eshed, Y., & Bowman, J. L. (2010). Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities. *The plant cell*, *22*(7), 2113-2130.
- Savini, G., Neri, D., Zucconi, F., & Sugiyama, N. (2005). Strawberry growth and flowering: an architectural model. *International journal of fruit science*, *5*(1), 29-50.
- Schirmer, T., Hoffmann-Sommergrube, K., Susani, M., Breiteneder, H., & Marković-Housley, Z. (2005). Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity. *Journal of molecular biology*, *351*(5), 1101-1109.
- Scheurer, S., Metzner, K., Haustein, D., & Vieths, S. (1997). Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Molecular immunology*, *34*(8-9), 619-629.
- Schrödinger, L. (2016). Schrödinger Suite. *Schrödinger, LLC, New York, NY*.
- Schulenburg, K., Feller, A., Hoffmann, T., Schecker, J. H., Martens, S., & Schwab, W. (2016). Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry. *Journal of experimental botany*, *67*(8), 2299-2308.
- Seutter von Loetzen, C., Schweimer, K., Schwab, W., Rösch, P., & Hartl-Spiegelhauer, O. (2012). Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Bioscience reports*, *32*(6), 567-575.
- Sherman, W. B. (1966). Inheritance of fruit size in strawberry. *Proceedings of the American society for horticultural science*, *89*, 309-317.
- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., Jaiswal, P., Mockaitis, K., Liston, A., Mane, S. P., Burns, P., Davis, T. M., Slovin, J.

P., Bassil, N., Hellens, R. P., Evans, C., Harkins, T., Kodira, C., Desany, B., Crasta, O. R., Jensen, R. V., Allan, A. C., Michael, T. P., Setubal, J. C., Celton, J. M., Rees, D. J. G., Williams, K. P., Holt, S. H., Rojas, J. J. R., Chatterjee, M., Liu, B., Silva, H., Meisel, L., Adato, A., Filichkin, S. A., Troggio, M., Viola, R., Ashman, T. L., Wang, H., Dharmawardhana, P., Elser, J., Raja, R., Priest, H. D., Bryant J, D. W., Fox, S. E., Givan, S. A., Wilhelm, L. J., Naithani, S., Christoffels, A., Salama, D. Y., Carter, J., Girona, E. L., Zdepski, A., Wang, W., Kerstetter, R. A., Schwab, W., Korban, S. S., Davik, J., Monfort, A., Denoyes-Rothan, B., Arus, P., Mittler, R., Flinn, B., Aharoni, A., Bennetzen, J. L., Salzberg, S. L., Dickerman, A. W., Velasco, R., Borodovsky, M., Veilleux, R. E. & Folta, Kevin M (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics*, 43(2), 109-116.

- Smits, A. H., & Vermeulen, M. (2016). Characterizing protein–protein interactions using mass spectrometry: challenges and opportunities. *Trends in biotechnology*, 34(10), 825-834.

- Son, D. Y., Scheurer, S., Hoffmann, A., Haustein, D., & Vieths, S. (1999). Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *European journal of nutrition*, 38(4), 201-215.

- Spangfort, M. D., Mirza, O., Ipsen, H., Van Neerven, R. J., Gajhede, M., & Larsen, J. N. (2003). Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *The journal of immunology*, 171(6), 3084-3090.

- Sun, Y., Li, H., & Huang, J. R. (2012). Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Molecular plant*, 5(2), 387-400.

- Sylvestre-Gonon, E., Law, S. R., Schwartz, M., Robe, K., Keech, O., Didierjean, C., Dubos, C., Routhier, N., & Hecker, A. (2019). Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases. *Frontiers in plant science*, 10.

- Thompson, E. P., Wilkins, C., Demidchik, V., Davies, J. M., & Glover, B. J. (2009). An Arabidopsis flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *Journal of experimental botany*, 61(2), 439-451.

- Tickle, I.J.; Flensburg, C.; Keller, P.; Paciorek, W.; Sharff, A.; Vornrhein, C.; Bricogne, G. (2018). Staraniso. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.

- Timmermann, T., Poupin, M. J., Vega, A., Urrutia, C., Ruz, G. A., & González, B. (2019). Gene networks underlying the early regulation of Paraburkholderia phytofirmans PsJN induced systemic resistance in Arabidopsis. *PLoS one*, 14(8), e0221358.

- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), 562.

- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H., & Lamond, A. (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *The journal of cell biology*, 183(2), 223-239.

- Upadhyay, N., Kar, D., Deepak Mahajan, B., Nanda, S., Rahiman, R., Panchakshari, N., Bhagavatula, L., & Datta, S. (2019). The multitasking abilities of MATE transporters in plants. *Journal of experimental botany*, erz246.

- Valenta, R., & Kraft, D. (1996). Type I allergic reactions to plant-derived food: a consequence of primary sensitization to pollen allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 97(4), 893-895.

- Vallarino, J. G., Osorio, S., Bombarely, A., Casañal, A., Cruz - Rus, E., Sánchez - Sevilla, J. F., Amaya, I., Giavalisco, P., Fernie, A. R., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2015). Central role of Fa GAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New phytologist*, 208(2), 482-496.

- Vallarino, J. G., Merchante, C., Sánchez-Sevilla, J. F., de Luis Balaguer, M. A., Pott, D. M., Ariza, M. T., Casañal, A., Posé, D., Vioque, A., Amaya, I., Willmitzer, L., Solano, R., Sozzani, R., Fernie, A. R., Botella, M. A., Giovannoni, J. J., Valpuesta, V., & Osorio, S. (2019). Characterizing the involvement of FaMADS9 in the regulation of strawberry fruit receptacle development. *Plant biotechnology journal*.
- Vanekkrebitz, M., Hoffmannsommergruber, K., Machado, M. L. D., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and biophysical research communications*, 214(2), 538-551.
- Vergauwen, D., & De Smet, I. (2019). The Strawberry Tales: Size Matters. *Trends in plant science*, 24(1), 1-3.
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. P., Yazaki, K., & Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in plant science*, 13(4), 151-159.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal*, 33(5), 949-956.
- Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T., & Bricogne, G. (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 67(4), 293-302.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.

- Wasternack, C., & Song, S. (2016). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of experimental botany*, 68(6), 1303-1321.

- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica section D: Biological crystallography*, 67(4), 235-242.

- Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F., & Chen, Z. X. (2008). Stress-and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular plant*, 1(3), 459-470.

- Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W., & Grefen, C. (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant physiology*, 171(2), 727-758.

- Yamada, A., Ishiuchi, K. I., Makino, T., Mizukami, H., & Terasaka, K. (2019). A glucosyltransferase specific for 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2 H)-furanone in strawberry. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 83(1), 106-113.

- Yeh, S. Y., Huang, F. C., Hoffmann, T., Mayershofer, M., & Schwab, W. (2014). FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in plant science*, 5, 518.

- Zander, U., Hoffmann, G., Cornaciu, I., Marquette, J. P., Papp, G., Landret, C., Seroul, G., Sinoir, J., Röwer, M., Felisaz, F., Rodriguez-Puente, S., Mariaule, V., Murphy, P., Mathieu, M., Cipriani, F., & Marquez, J. A. (2016). Automated harvesting and processing of protein crystals through laser photoablation. *Acta crystallographica section D: Structural biology*, 72(4), 454-466.

- Zhang, H., Zhao, F. G., Tang, R. J., Yu, Y., Song, J., Wang, Y., Li, L., & Luan, S. (2017). Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels

in Arabidopsis. *Proceedings of the national academy of sciences*, 114(10), E2036-E2045.

- Zuidmeer, L., Salentijn, E., Rivas, M. F., Mancebo, E. G., Asero, R., Matos, C. I., Pelgrom, K. T. B., Gilissen, L. J. W. J., & Van Ree, R. (2006). The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical & experimental allergy*, 36(5), 666-675.

Material suplementario

Oligonucleótidos usados

Tabla S1. Oligonucleótidos usados en este capítulo y los tamaños de los fragmentos que amplifican.

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)	Función
Comp.cont.Fdw	GACTCGAGGTCGACGGTATC	460	Amplificación en la región EYFP de los contaminantes
Comp.cont.Rev	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	460	Amplificación en la región EYFP de los contaminantes
PP12 Fdw CACC	CACCATGGATGGGTCTCAAGGTGG	1320	Amplificación de HSTF con región CACC
PP12 STOP Rev	CTATGTAGCTGGAGTGAGGCG	1320	Amplificación de HSTF
OPACT-1	ATGATGAAGATACCCC	-	Amplificación en Gal4 AD (pGADT7)
OPACT-2	TTGAAGTGAACCTGCG	-	Amplificación sitio final de inserción en pGADT7
Fra1 pENTRY F	CACCATGGGTGTTTACACTTATG	483	Amplificación de Fra a 1.01
Fra1 pENTRYN R	TTAGTTGTATTTCGCTGGGGTGGTC	483	Amplificación de Fra a 1.01
Fra2 pENTRY F	CACCATGGGTGTGTTCACTTATG	483	Amplificación de Fra a 1.02
Fra2 pENTRYN R	TTAACAGTATTCATTAGGATTGGC	483	Amplificación de Fra a 1.02
Fra3 pENTRY F	CACCATGGGTGTGTTACATAC	483	Amplificación de Fra a 1.03
Fra3 pENTRYN R	TTAGTTGTATTCTCAGGATGGG	483	Amplificación de Fra a 1.03
GADPH Fdw	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	132	Amplificación de GADPH
GADPH Rev	AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG	132	Amplificación de GADPH
Actina Fdw	GGTATTGTGAGCAACTGGGATG	129	Amplificación de actina
Actina Rev	ACGATTAGCCTTGGGATTGAGG	129	Amplificación de actina
CHP1 Fdw	TGCATATATCAAGCAACTTTACTGTA	91	Amplificación de CHP1
CHP1 Rev	ATAGCTGAGATGGATCTTCTGTGA	91	Amplificación de CHP1
ULP1 Fdw	AGGCGACAGTATGGGACAGCC	512	Amplificación ULP1
ULP1 Rev	GGCCAAGAAGAACTTGTTC	512	Amplificación ULP1
35S Fw	AGGAGCATCGTGGA AAAAAGA	880	Amplificación 35S
PDK Rv	TCTTGCGCTTGTATATTAGCAT	880(35S)/1014(EXP)	Amplificación PDK
EXP Fd	ATGTGCAGGTAGGGACCTTG	1014	Amplificación EXPANSINA
EGFP Fw	CAAGGGCGAGGAGCTGTT	602	Amplificación GFP
EGFP Rv	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG	602	Amplificación GFP
F2 sil.XbaI F	AATCTAGAGAAGGAGACGGAGGCGTAG	140	Amplificación fragmento silenciamiento con XbaI
F2 sil.XhoI F	AACCTGAGGAAGGAGACGGAGGCGTAG	140	Amplificación fragmento silenciamiento con XhoI
F2 sil.EcoRI F	AAGAATTCGAAGGAGACGGAGGCGTAG	140	Amplificación fragmento silenciamiento con EcoRI
F2 sil.HindIII R	AAAAGCTTCCAACTGTAGCTGTACACA AA	140	Amplificación fragmento silenciamiento con HindIII
F2 sil.KpnI R	AAGGTACCCCAAACCTGTAGCTGTACACA AA	140	Amplificación fragmento silenciamiento con KpnI

Recombinante 1

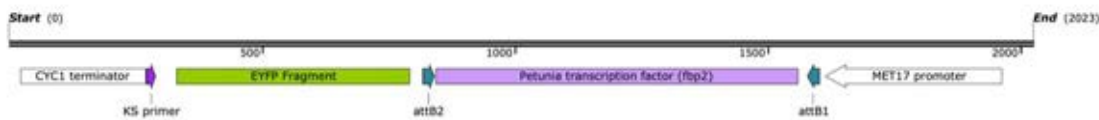


5'

TAGGGCGATTGGGTACCGGCCGCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCCAAAAACCTTCTCAAGCAAGGTTTTTCAGTATAATGTTAC
 ATGCGTACACGCGTCTGTACAGAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACGTTCTTAATACTAACATAACTATAAAAAAAT
 AAATAGGGACCTAGACTTCAGGTTGTCTAACTCCTTCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGT
 GACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTACATGA
 TATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTAICTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCT
 CGATGCGGTTACACAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACTCGGCCGCGGGTCTTGTAAGTTGCCGTCGCTCTTGAAGAAGATGGTG
 CGCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTCTCATGTGGTCGGGGTAGCGGGCGAAGCACT
 GCAGGCCGTAGCCGAAGGTGGTCACGAGGGTGGCCAGGGCAGGGCAGCTTGGCCGTTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCA
 GCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGG
 ATGGGCACCACCCCGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGTAGCAATAGAACGCTTAGATCGAACCCTTTGTACAA
 GAAAGCTGGGGTCTCAAGCTGGAGAGACTTCTTGTATGACGAGCAATGGATCATAANAAGGCACACCTCCTTCCATCATA
 TTGAGGTTGAAGCATGTTTCTTGCAAAATATTCTGCAAAATATGNTGAAATGCATGNTACTCTTGNCCAGTAGCTGGCATCAT
 GNTTAGTNCCTGCAGCCTTTCATTTCTGCTACTTGTATNTAAGGAATGATTTTCTGTTCCAGTGAATTTCCCTCTTGTGCAAAAT
 TCTCAGTCTCAGCTAGTATCATTTCATGCTTCTTGTACNTAATCTNGTAATTCCTCGTTCAAGCCTGTTCTCTAACTGCTCAGT
 TCCCTCACATTCAAAGCGCTCAAGCCTTCAACCACAGATGCCTATTTGTGTTCTGCAGTAATTGTATCTGTTGGCGCAGCTTC
 TTTGATTCTTGTGGTAAACTGTGCATTCAGCTCCTGAGTAGTGCAGGCATTAGAAGTTTCTGCAGTTGCCTTCTGTACCGT
 TCTATGGTTCCCTTTATGTTGTTGTAGCGTATTCATAGACGCGGCCAGGGTGGAGAAGACAATGAGAGCAATCTCAGCATCA
 CAAAGAACTGAAAGTTCGTAAGCTTTTTTGAGGAGTCCATTTCTCCTTTCAGAAAAGTCACCTGCCTAATTTGTGTTGTTCTCG
 ATCCTCTTTATCTCTATCTTCCCTCCTCCCATGGTTCTATCTCCTTTCGAAGCCTGCTTTTTTGTACAAACTGTTTGATCTAGAGT
 ATGGATGGGGTAATAGAATTGTATCTATGTATCTGACGACCCTGTATTACACGAAGGAAATAGTAGATGAAAAGACAAGAGA
 GCAAGAAAAAGGAAAAACTCCTTTCTAACAGACGCTTACTTAACTTATATATATCTTATTTTTTCATCGAGCGTGTCAAT
 TGGACAAGGTGCCACCTTTTCGACACTTCGGTTATTATGTTACACAGTTTTCATGAGGATGGCGCCTTACTAACTAATTAGT
 CATTGCAACCAACACAGTTCCCAATATCGACAGCTTCAAGTGCCATTTGCCATTTTGCATCATGTGACCTCAAGAGAAAA
 AGCAAAAATAATGAGAGCTAAGGGATTCGAACCTTGCATCCGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGG 3'

Figura S1. Secuencia de DNA de la región secuenciada del plásmido contaminante R1. En la parte de arriba de la Figura se representan esquemáticamente los genes encontrados en la secuencia, que son *EYFP* y *fbp1*, así como el promotor de levaduras MET17 y el terminador de levaduras CYC1. La parte de abajo corresponde a la secuencia en nucleótidos de la región secuenciada del plásmido.

Recombinante 2



5'

ATAGGGCGATTGGGTACCGGCCGCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCCAAAACCTTCTCAAGCAAGGTTTTTCAGTATAATGTTAC
 ATGCGTACACGCGTCTGTACAGAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACGTTCTTAATACTAACATAACTATAAAAAAATA
 AATAGGGACCTAGACTTCAGGTTGTCTAACTCCTTCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTG
 ACATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTACATGATA
 TAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGACTCCAGCTTGTGCCCAGGATGTTGCCGCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCG
 ATGCGGTTACACAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGCTTGAAGAAGATGGTGGC
 CTCCTGGAGCTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTGGGGTAGCGGGCGAAGCACTGCA
 GGCCGTAGCCGAAGGTGGTACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACCTCAGGGTCAGCTT
 GCCGTAGGTGGCATGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACCTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGATGG
 GCACCACCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGTAGCAATAGAACGCTAGATCGAACCACTTTGTACAAGAAA
 GTCGGGTCAGGCAACCAGCCAGCCATGTAGTTATTCACACTGGCCCTGCTCCTCTACTGTTATGGATCCTTTTGATACCCCTA
 TTGTAAGTGGGTTCAACATTCCAAGGATGAAAGAAGCCATCCTGAGTTTGTAGTTGCTGCGTAGCCANATCTTG
 CATTGTNCACTGCAGANTAGTGTGCTTCTTCCATCAACCTTTGTTTCAAGGTTCTGTTTGTCTCGTTTAAATGCAITGTTCTTT
 CTCTGAAGATCTTGAAGTTGATCCAACATCAGCTGAGTCCGAGTTGATCTGATTTGTTTCAAGTACATATCAAGTGCCTTTCAA
 GTGATTCAGGTTCTTTGCTGTTCAAAGGGCAAGATCTTACCAAGAAGATTCCTCTGTGATCGCTGAATGCTTCGTAACGTCG
 CTTAAAGCTTCAAGTACTCTTGTGGCTGCTTATTCAGTGTCTTCTGTGGATATATAGTCTCTGGTGTCCATAGTACAC
 TTCTGGTACCTCTTAAGGCTTGTAGCATGCTAGAGTACTGCAAACTCGTACAATTTCCCTATTAGAGAAAATAAAGAG
 CAATTCAGCATCAAAAGAACAGAAAGTTCATAAGCTTTTTCAAATAGTCCATTTCTTCTTAGCAAAGGTAACCTTTGCTATT
 GATTTTGTCTCTTCTTAAGCTCAACTTACCTTCCATGCTTCTATCTCCTTTTCAAGCCTGCTTTTGTACAAAAGTTG
 TTGATCTAGAGTATGGATGGGGTAATAGAATTGTATCTATGATCTGACGACCTGTATTACACGAAGGAAATAGTAGATGAAA
 AGACAAGAGAGCAAGAAAAGGAAAAAATTCTTTCTAACAGACGCTTACTTAACCTTATATATATCTTATTTTTCATCGAC
 CGTGTTCATTGGACAAGGTGCCACCTTTTCGACACTTCGGTTATTATGTTACACAGTTCATGAGGATGGCGCCTTGACTAAC
 TTAATTAGTCATTTGCCAACCCACAGTTCCCAATATCGACAGCTTACAGTGCACATTGGCCATTTTGGCATCATGTGACTCA
 AGAGAAAAGCAAAAATAATGAGAGCTAAGGGATTGCAACCCTTGCATCCGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTAGTGAGG 3'

Figura S2. Secuencia de DNA de la región secuenciada del plásmido contaminante R2. En la parte de arriba de la Figura se representan esquemáticamente los genes encontrados en la secuencia, que son *EYFP* y *fbp2*, así como el promotor de levaduras MET17 y el terminador de levaduras CYC1. La parte de abajo corresponde a la secuencia en nucleótidos de la región secuenciada del plásmido.

5'

ACAAGTTGTACAAAAAGTTGGCTTGTGGCTCGAAGCTATGGATGGGTCTCAAGGTGGTTCGAATGCACCGGCTCCT
 TTTCTTTGAAAACATATGACTTGGTGGATGATCCTTCAACCAACCATGTGGTTTCTTGGAGTGAAAGTGGTGGTAGTT
 TTGTAGTTTGGGATCCACAGAGTTTGCACAAGGATTTGCTTCCATGTATTTCAAGCACAACTTTTTCAGTTTGT
 CAGGCAGCTTAATACATATGGGTTCAAGGATTTGATCCTGAGCAGTGGGAGTTTGCAAATGAGGAATCTTGTAGAGG
 AGGAAGACGCTACTGAAAGATATCACCGCCGCAAGCCAATTCATAGTCATTCCTGCAGAATCACGAGTACTTTC
 AGTTCCATTAAGCGAGACAGAAAGGGAAGAATATGAAAAGAAAATCAATAGACTGAATAATGATAAGAACTTGTGTA
 GCTAGAGCTACAAAGACATCAAAGGGGAGAAATCAGGAGTTTGAATTCCAAATGAAATTTTAAATGAACAATTGCAA
 AGATGAACTTCGGCAGAGGCAATATACGACCTTCTAGCTCAAGTATTGCAAGAAGCCAGGGTTTGGCTCTTACTTAT
 GCAACAATCGGAAAATCATAACAAAAGAGAAGACTATTGAAACCTAACCTATTTCTGAAGACTTCAGTATGGAAGG
 TTTGAAITTTGAATTCACAGAAAAGAGAACCTGGATTCAAGTTTCAACTTCCACATCAAAGTCAGAGCGGCTTGAGAAAAT
 GGAGTCTTCTTGAACCTTTTGGGAAGATTTTATACGTGCGATTGGAGAAGCTATGCCCTGAAGAAGTAAATGATATGGG
 CCTATGCTGTGGCTCTCCCATATGTTTTCAGAAATACAGACCTTGGCATGAATAGCAGGCGGTTTCACTATATC
 AAATTCATCTCACCGACTTCAATGACTGTTTCAATCGTCCAGAGGTTGGTGGTCTGCAAACTTTTGTACATCCTT
 GCTATCTCATCAATGATCAATCTGGTGAATTTGAGGCTAAATCTTCAGGACTTGATATGAACTTTAAGCCTGATAGTGC
 ACCTGCAGTTGAGACTCCAAAAGAAAGGGCAGTGGAAATGACAGCTGCTGAGCCTGCTGCAGCAAATGATATGTTTT
 GGGAGCAATGTTTACAGAGACCCCTGGTTTGAAGATGCGCAGGAAGTACAATCGGCAAGAAGGGATGGTGTAGGC
 GGAGCAAGTGATACCAATACAGCTGCTCAGAAAAGCTTTGGTGGAAACACAGATAATGTAGATAACTTTACAAAACCAA
 ATAGGGCGCCTCACTCCAGCTACATAGTTACAATTTGGCCTTATAATGTAACACTTAATATATACATCTTAAACGTTATAT
 AGAATTACTTAGTATGACTTTTITAGAAAGCCATTCAAAATTTGTAGACTGTTGGCATATCTGGGAATATTTGATTACTT
 CTGATGACTGGGAATTAGAGATAGTCAATAGTCTTCTATGACAGATGACTAAATGATTTCAAGTGGCAAAAAA
 AAAAAAACCCTTCTTGTACAAAGTGGTTTGTAGGCGCTAAGTAAGTAAGACGTCGAGCTCAAGTAA
 GTAACGGCCGCCCT 3'

Figura S3. Secuencia de *FaHSF3*. Secuencia encontrada entre los sitios *attB* del plásmido *pDEST22*, la región codificante del gen *FaHSF3* comienza en el nucleótido 40 y termina en el 1359, las regiones anteriores y posteriores corresponden a los extremos 5' y 3' de este gen.



Figura S4.- Dendrograma y clasificación de las secuencias aminoacídicas de las GST de *F. vesca*. Las GST diferencialmente expresadas en las líneas de silenciamiento con respecto al control están señaladas con un asterisco rojo.

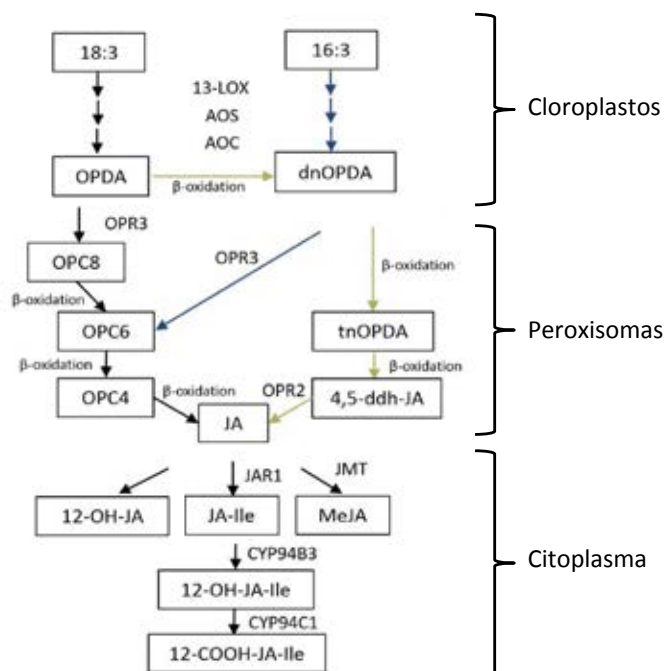


Figura S5.- Ruta de biosíntesis de ácido jasmónico en *Arabidopsis*. Las abreviaturas de las enzimas corresponden a las siguientes, LOX: lipoxigenasa, AOS: aleno oxido sintasa, OPR3: OPDA reductasa, JAR1: jasmonato resistente 1, JMT: JA carboxil metiltransferasa, 18:3: ácido α -linoleico, 16:3: ácido hexadecatrienoico, OPDA: ácido 12-oxo-fítodienoico, dnOPDA: ácido dinor-12-oxo-fítodienoico, OPC8: ácido 8-(3-oxo-2-(pent-2-enil)ciclopentil) octanoico, OPC6: ácido 6-(3-oxo-2-(pent-2-enil)ciclopentil) hexanoico, OPC4: ácido 4-(3-oxo-2-(pent-2-enil)ciclopentil) butanoico, tnOPDA: tetranor-OPDA, 4,5-ddh-JA: 4,5-didehidrjasmonato, JA: ácido jasmónico, JA-Ile: jasmonil-L-isoleucina, MeJA: metil jasmonato. Figura adaptada de Ruan *et al.*, 2019.

Anexo I.- Genes diferencialmente expresados en las líneas transgénicas. Anotaciones de los genes y valores de expresión en las líneas transgénicas (FKPM).

Anexo II.- Categorías GO de los genes diferencialmente expresados.