



TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE FRESA
IMPLICADO EN LA AUTOFAGIA EMPLEANDO UN SISTEMA
HETERÓLOGO Y ESTUDIO DE POSIBLES DIANAS.**

**CHARACTERIZATION OF A STRAWBERRY TRANSCRIPTION
FACTOR INVOLVED IN AUTOPHAGY USING A HETEROLOGOUS
SYSTEM AND STUDY OF POSSIBLE TARGETS.**

AUTOR

Raúl Peralta García

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2023
Tutoras	Dra. D ^a . Victoria Sánchez Vera ; Dra. D ^a . Noemí Ruiz López
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Málaga ; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM)
Curso	<i>Máster Oficial en Biotecnología Avanzada (2021-22).</i>
©	<i>Raúl Peralta García</i>
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2022



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

2021-2022

**CARACTERIZACIÓN DE UN FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN DE FRESA IMPLICADO EN
LA AUTOFAGIA EMPLEANDO UN SISTEMA
HETERÓLOGO Y ESTUDIO DE POSIBLES
DIANAS**

**CHARACTERIZATION OF A STRAWBERRY
TRANSCRIPTION FACTOR INVOLVED IN AUTOPHAGY
USING A HETEROLOGOUS SYSTEM AND STUDY OF
POSSIBLE TARGETS**

Autor: Raúl Peralta García

Co-tutor 1: Victoria Sánchez Vera

Co-tutor 2: Noemí Ruiz López



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TFM

D. Raúl Peralta García, con DNI

DECLARA que es autor del presente Trabajo de Fin de Máster, titulado: “Caracterización de un factor de transcripción de fresa implicado en la autofagia empleando un sistema heterólogo y estudio de posibles dianas”. Que ha cumplido con las obligaciones legales sobre la propiedad intelectual e industrial y que además es un trabajo original, no habiéndose utilizado fuentes bibliográficas sin ser citadas debidamente.

De no cumplir con este compromiso, el abajo firmante es consciente de que, de acuerdo con la Normativa de Evaluación y de Calificación de los estudiantes de la Universidad de Málaga de 14 de marzo de 2018, esto conllevará automáticamente la calificación numérica de cero, independientemente del resto de las calificaciones que hubiera obtenido. Esta consecuencia debe entenderse sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que se pudieran incurrir.

En Málaga, a 24 de septiembre de 2022

Fdo.



RESUMEN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es un cultivo de elevada importancia económica en el sur de España. Se trata de un fruto no climatérico, por lo que su maduración en la planta es esencial para el correcto desarrollo de sus características organolépticas. La autofagia es un sistema de reciclaje de componentes celulares y se ha demostrado que tiene un papel fundamental en la maduración de la fresa. Este TFM se ha centrado en estudiar un posible regulador de la autofagia durante la maduración del fruto de fresa. En *Arabidopsis*, el factor de transcripción (FT) TGA9 (AtTGA9) actúa como regulador de la autofagia sobre genes relacionados con ella (*genes ATG*). Entre otras, se ha descrito la interacción entre AtTGA9-*ATG8* y es por ello que este trabajo y sus futuros avances se centran en abordar esta relación en *F. x ananassa*. En este proyecto se ha clonado *AtTGA9* y se ha estudiado a través de un sistema heterólogo la localización subcelular de TGA9 de *F. x ananassa* (FaTGA9) y AtTGA9 (empleado como control). Ambas proteínas se han localizado en el núcleo celular, lo que indica que FaTGA9 también podría actuar como FT regulando la autofagia. Por otro lado, se han analizado posibles dianas de esta proteína, y entre ellas, se ha puesto a punto la amplificación de los promotores de diferentes genes *ATG8*, que codifica para unas proteínas esenciales en el proceso de la autofagia.

Palabras clave

Fragaria x ananassa, autofagia, TGA9, Factor de transcripción, *genes ATG*.



SUMMARY

Strawberry (*Fragaria x Ananassa*) is a high economic importance crop in the south of Spain. It is a non-climacteric fruit, so its maturation in the plant is essential for the suitable development of its organoleptic characteristics. Autophagy is a cellular component recycling system and it has been shown that it has a fundamental role in strawberry maturation. This master thesis has focused on studying a possible autophagy regulator during strawberry fruit ripening. In Arabidopsis, the transcription factor (TF) TGA9 (AtTGA9) acts as regulator of Autophagy-related genes (*ATG genes*). Among others, the interaction between AtTGA9-*ATG8* has been described and that is why this study focuses on investigating this relationship in *F. x Ananassa*. In this research, *AtTGA9* has been cloned and the subcellular location of *F. x Ananassa* TGA9 (FaTGA9) and AtTGA9 (used as control) has been studied through a heterologous system. Both proteins have been located in the cell nucleus, this indicates that FaTGA9 could also act as TF regulating autophagy. On the other hand, possible targets of this protein have been analyzed, and among them, the promoters's amplification protocol of different *ATG8* genes, which encodes for essential proteins in the autophagy process, has been established.

Key words

Fragaria x ananassa, autophagy, TGA9, transcription factor, *ATG genes*.



ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. La fresa y su fruto	7
1.2. Contexto económico del cultivo	8
1.3. El proceso de la autofagia	9
1.4. Regulación de la autofagia en plantas	10
1.5 Interacción TGA9- <i>ATG8</i>	11
1.6 Estudio de la autofagia en fresa	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODO	15
3. 1. Extracción de ADN genómico	15
3. 2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	15
3. 3. Amplificaciones por PCR	16
3.3.1. PCRs de baja fidelidad con GoTaq	18
3.3.2. PCRs de alta fidelidad con iProof	18
3.4. Clonaciones	20
3.4.1 Clonación de <i>TGA9</i> en el vector final	20
3.4.2. Clonación de los promotores	21
3.5. Transformación en <i>Agrobacterium</i> e infiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	22
3.6. Observación en el Microscopio confocal	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Caracterización de TGA9 de F. x ananassa y de Arabidopsis en <i>Nicotiana benthamiana</i>	24
4.1.1 Estudio de identidad entre AtTGA9 y FaTGA9	24
4.1.2. Análisis bibliográfico de expresión de TGA9, extracción de ARN y síntesis de ADN copia	24



4.1.3. Amplificación de <i>TGA9</i>	26
4.1.4. Inclusión en el vector final	27
4.1.5. Transformación en <i>Agrobacterium</i> e infiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	27
4.1.6. Observación en el microscopio confocal.	28
4.2. Puesta a punto de PCRs y clonación de promotores	30
4.2.1 Análisis de promotores de posibles dianas de FaTGA9	30
4.2.2. Extracción de genómico y comprobación de su calidad	31
4.2.3. PCR de baja fidelidad para optimizar la Temperatura de alineamiento	33
4.2.4. Optimización del protocolo de PCR	33
4.2.5. PCR de alta fidelidad con las condiciones óptimas	36
4.2.6. Digestión de insertos y plásmido	37
4.2.7. Intentos de ligación y clonación	37
5. CONCLUSIONES	41
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43
8. ANEXOS	47
8.1. Anexo 1: Alineamiento de TGA9 y predicción de estructura.	47

ABREVIATURAS

ADNc: ADN cadena

FaTGA9: TGA9 de *F. x ananassa*

AtTGA9: TGA9 de Arabidopsis

FT: Factor de transcripción

Genes ATG: Genes relacionados con la autofagia



1. INTRODUCCIÓN

1.1. La fresa y su fruto

La fresa es un cultivo vegetal herbáceo y perenne, de la familia *Rosaceae* y perteneciente al género *Fragaria*, un género que engloba 5 especies híbridas y más de 20 especies silvestres (Hummer & Hancock, 2009). Este trabajo se centra en *Fragaria x ananassa*, la fresa cultivada en mayor proporción, que es una especie híbrida procedente del cruce de 2 especies americanas de fresa octoploide a su llegada a Europa: *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, presentando así una dotación genética de un total de 56 cromosomas ($2n=8x=56$) (Liston *et al.*, 2014; Simpson, 2018).

En la fresa, la parte carnosa no son los ovarios de la planta, que dan lugar a los frutos, como suelen ser en los cultivos frutales, sino que es el receptáculo floral que sostiene a los ovarios de la planta, aquenios, que se encuentran incrustados en él (Figura 1) (Liu *et al.*, 2020; Poling, 2012). El fruto de la fresa, es una denominada infrutescencia, un conjunto de frutos pegados, los aquenios, unos a otros que dan apariencia de un gran fruto.

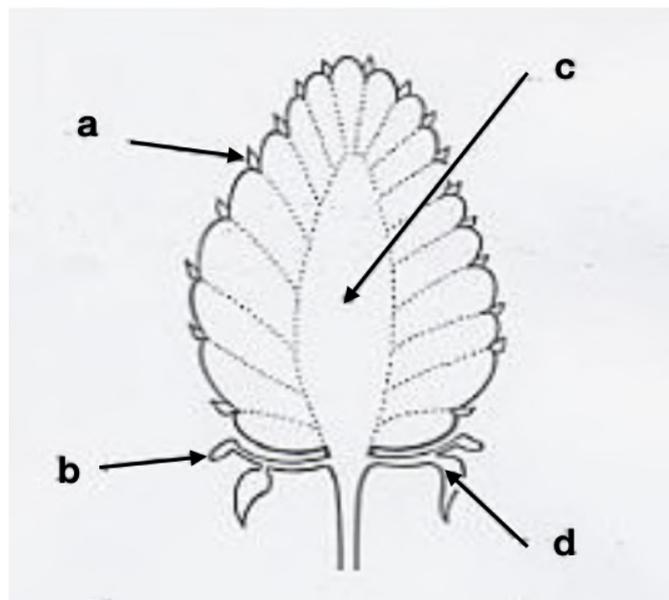


Figura 1. Partes principales de la fresa como fruto: (a) aquenios, (b) estambres, (c) receptáculo floral y (d) sépalos (Poling, 2012).



1.2. Contexto económico del cultivo

La fresa, además de una fuente rica en vitamina C y flavonoides (Giampieri *et al.*, 2012), es una de las bayas con mayor importancia económica, y debido a su creciente demanda, la producción se ha ido aumentando año a año (FAOSTAT agricultural data, 2020). Hasta el siglo XVII la especie que se cultivaba principalmente era la silvestre, *Fragaria vesca*, sin embargo, esta se fue reemplazando por la nueva variedad, *F. x ananassa*, a su llegada en el siglo XVIII (Hummer & Hancock, 2009). Esto se debió al mayor tamaño del fruto y al mayor dulzor en el sabor de la nueva especie, que la hacía más valorada tanto por los productores como por los consumidores (Simpson, 2018).

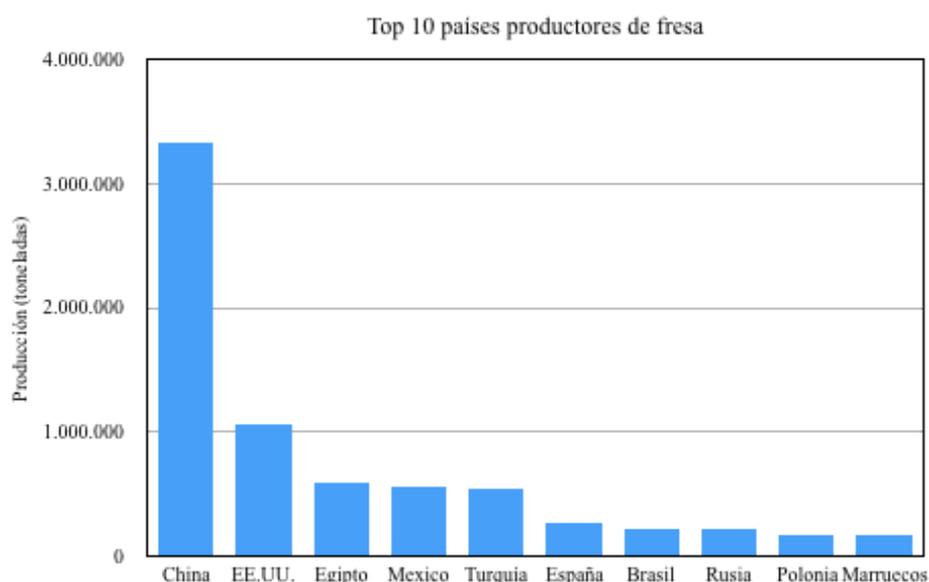


Figura 2. Clasificación de los 10 países con mayor producción de fresa (FAOSTAT agricultural data, 2020).

Respecto a la producción mundial de fresa, España se encuentra entre los mayores exponentes acaparando en torno al 4% de la oferta, cuyo 90% se produce en Huelva, debido a las óptimas condiciones climáticas presentes en el sur del país que favorecen el cultivo de esta especie. España es el sexto mayor productor del mundo y el primero de Europa a excepción de Turquía (Figura 2) (FAOSTAT agricultural data, 2020). Debido a la importancia de este cultivo en nuestro país y su contribución en la economía española a través de los ingresos generados en la exportación, el estudio de la fresa se encuentra en auge por las potenciales repercusiones que pueden tener sus avances.

La fresa, sin embargo, presenta problemas para su comercialización y exportación a países lejanos de Europa y del mundo, por ello, su producción está tan repartida por el globo.



Además, es un fruto no climatérico, es decir, que debe alcanzar su madurez en la planta antes de ser cosechado, y posee un alto contenido en agua por lo que presenta una estructura delicada y poco consistente provocando un deterioro poscosecha muy rápido. Tales características en el comercio con lugares lejanos repercuten en la calidad final del fruto, tanto por el tiempo y coste que requiere el transporte del producto como los posibles golpes que pueda recibir, llegando en unas condiciones subóptimas para el consumidor (Simpson, 2018).

Por ello, se llevan a cabo estudios que se enfocan en entender qué procesos tienen lugar en la planta que provocan la tan rápida maduración del fruto. Teniendo como fin desarrollar aplicaciones tecnológicas en el cultivo y comercio de la fresa resolviendo las problemáticas existentes, y aportar especialmente a España, como uno de los principales productores, unas mejores posibilidades de exportación ligadas a un mayor flujo de ingresos por esta vía.

1.3. El proceso de la autofagia

La autofagia es un proceso catabólico presente en eucariotas por el cual, las células, degradan sus orgánulos y componentes viejos o dañados presentes en el citoplasma para reciclar las macromoléculas que los componen y usarlas para llevar a cabo las funciones que necesiten. Se activa especialmente en condiciones de estrés o falta de nutrientes (Rabinowitz & White, 2010) y también ayuda a mantener la homeostasis celular (Marshall & Vierstra, 2018).

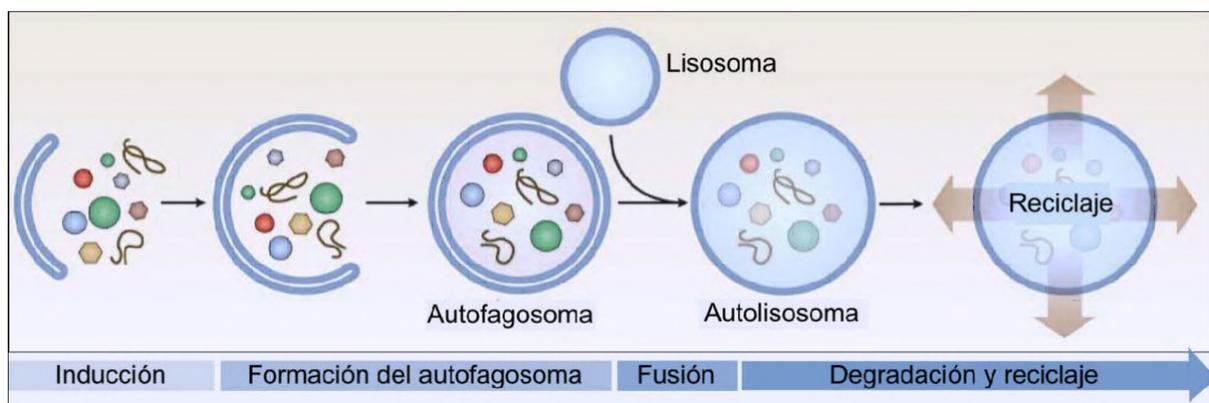


Figura 3. Fases del proceso de la autofagia (Boya, 2017).

Este proceso se realiza a través de autofagosomas, estructuras de doble membrana que se forman en el proceso de la autofagia para capturar el material citoplasmático. Una vez capturado, se desplazan hasta las vacuolas/lisosomas para fusionarse con ellas dando lugar a autolisosomas y liberando el material en su interior (Figura 3). Estos últimos presentan proteasas e hidrolasas vacuolares en su interior que producen finalmente la degradación y por ende el reciclaje (Wen & Klionsky, 2016).

La autofagia se encuentra en funcionamiento en las plantas a un nivel constitutivo bajo como un proceso de mantenimiento eliminando el contenido citoplasmático obsoleto. Sin embargo, este se ve potenciado durante diversas condiciones ambientales que resultan desafiantes para la planta además de estar involucrado en la senescencia foliar (Tang & Bassham, 2018). En esos casos, es esencial para una asignación adecuada de los nutrientes que permita seguir llevando a cabo las funciones necesarias para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de la planta (Marshall & Vierstra, 2018; Michaeli *et al.*, 2016). Se ha comprobado que líneas que carecían de proteínas funcionales provenientes de los *genes ATG* muestran un peor comportamiento generalizado de la planta, con un crecimiento y fecundidad reducidos, senescencia acelerada y prematura, además de una alta sensibilidad tanto al estrés biótico como abiótico (Li & Vierstra, 2012).

1.4. Regulación de la autofagia en plantas

Respecto a la inducción de la autofagia se sabe que en plantas la formación de los autofagosomas está regulada por 2 complejos principales de quinasas, las cuales son enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfatos de unas moléculas a otras para activarlas o inactivarlas. El complejo quinasa ATG1, el cual es el interruptor principal que activa la autofagia, está regulado por quinasas que responden a las señales nutricionales y al estrés (Hurley & Young, 2017; Rodríguez *et al.*, 2019). Por otro lado, está el complejo fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que interviene en la remodelación de las membranas autofágicas (Zhuang *et al.*, 2018). También se ha confirmado que los estreses en el retículo endoplasmático y por sequía influyen en esta activación (Bao *et al.*, 2018; Bao & Bassham, 2020).

Además, la regulación del proceso está mediada por fitohormonas, las cuales son moléculas producidas por las propias células en concentraciones bajas para actuar como mensajeras



químicas, especialmente en procesos fisiológicos (Srivastava, 2002). A su vez, la retroalimentación de la autofagia influye y equilibra la biosíntesis de estas y sus vías de transducción de señales. Diversos resultados demuestran que la autofagia podría regular con precisión múltiples vías de señalización de fitohormonas al degradar los componentes de la señal (Cao *et al.*, 2021).

Otros mecanismos como la regulación transcripcional de los *genes ATG* o los cambios epigenéticos, como la modificación de histonas y metilación del ADN, pueden influir en la expresión de estos genes y en los procesos autofágicos posteriores (Cao *et al.*, 2021). Entre ellos, los factores de transcripción desempeñan un papel importante en el control de varios procesos de desarrollo de las plantas y las respuestas a diferentes estímulos externos. El primer FT vegetal descubierto que regula transcripcionalmente los *genes ATG* fue el HsfA1a de tomate, que se une directamente a los promotores de *ATG10* y *ATG18F* y mejora sus niveles de transcripción bajo estrés por sequía (Wang. *et al.*, 2015). Posteriormente, en tomate se ha descubierto que pueden ser elementos clave en la vías de señalización de algunas fitohormonas que regulan transcripcionalmente la autofagia, especialmente a través de los *genes ATG* y genes que intervienen en la formación de autofagosomas (Wang *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2020).

1.5 Interacción TGA9-ATG8

El gen *ATG8* y su proteína tienen un papel central en el proceso de la autofagia. Una vez lipidada, esta se localiza unida a la membrana de los autofagosomas e interviene en la modelación de estos mediando la unión, elongación y fusión de la membrana tanto con la carga como con el lisosoma (Nakatogawa *et al.*, 2007; Lee & Lee, 2016). Se ha concluido que los niveles de proteína y de transcritos de *ATG8* aumentan después de la inducción de la autofagia. Por lo tanto, la regulación de la expresión de *ATG8* se puede tomar como un punto importante de la regulación del proceso de la autofagia (Kirisako *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis* las proteínas *ATG8* están codificadas por 9 genes, desde *ATG8A* hasta *ATG8I*, con distintos patrones de expresión espacial y temporal en diferentes tejidos. Esto



sugiere que las distintas proteínas de *ATG8* están reguladas por diversos factores e intervienen en diferentes funciones (Sláviková *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

En estudios recientes se analizaron las interacciones de una librería de FT con 4 promotores de *ATG8* a través del ensayo de un híbrido de levadura (Y1H). De las interacciones que se identificaron, un subconjunto se validó en protoplastos de *Arabidopsis*. Esto se realizó a través de un ensayo en el que se sobreexpresaba el FT constitutivamente y se analizaba la expresión transitoria de la luciferasa (*LUC*) antepuesta por el promotor concreto del gen *ATG8*. Se confirmó que un FT de la familia de las proteínas con dominio de cremallera de leucina básico (b-ZIP), el TGA9, aumenta la expresión de manera significativa de algunos genes *ATG* al unirse a la secuencia objetiva (TGACG) en sus promotores, entre los que destacan *ATG8B* y *ATG8E* (Maleck *et al.*, 2000). Además, se comprobó que la sobreexpresión de TGA9 activa la autofagia en condiciones de ausencia de sacarosa y bajo estrés osmótico, lo que indica que TGA9 es un regulador positivo de esta. Esta relación TGA9-autofagia se reafirmó en ensayos de protoplastos con mutaciones en los promotores de los genes *ATG* y en presencia de inhibidores de la autofagia de manera independiente, donde la activación de este proceso por TGA9 se reprimió (Wang *et al.*, 2020).

1.6 Estudio de la autofagia en fresa

En diversos cultivos, se ha estudiado la autofagia en relación a la senescencia de las hojas, a la formación vascular y al desarrollo reproductivo y de semillas (Tang & Bassham, 2018). Recientemente, también se ha estudiado el papel que desempeña este proceso en la maduración del fruto de fresa (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2021).

En este último, la presencia de la autofagia a nivel celular ha sido confirmada en el fruto a través de la identificación de diferentes estructuras relacionadas con el proceso en diversas etapas de la maduración. Se concluyó que la mayoría de los genes *ATG* se conservan en el genoma de la fresa y su expresión es notablemente diferente en diversas etapas de la maduración del receptáculo del fruto. También comprobaron que el bloqueo de la autofagia ya sea bioquímica o genéticamente, afectaba de manera importante al crecimiento y maduración de la fresa. Concretamente, el bloqueo genético se realizó silenciando 2 genes esenciales para el proceso de lipidación de *ATG8*, el cual, es un paso necesario para la



formación de autofagosomas. Ambos bloqueos, tuvieron como consecuencia un menor tamaño del fruto y en un retraso significativo en la maduración de este (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

En *Arabidopsis*, se ha identificado un FT que regula la expresión de un gen que posee un papel importante en la autofagia, concretamente en la formación e interacción de los autofagosomas. En este trabajo se pretende determinar si el gen ortólogo de *F. x ananassa* podría actuar también como factor de transcripción y hacerlo sobre genes relacionados con la autofagia.

Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo es hacer una caracterización inicial del FT TGA9 homólogo de fresa y en llevar a cabo la puesta a punto de las amplificaciones de posibles promotores diana.

Hipótesis:

Al detectar por fluorescencia la proteína GFP unida a FaTGA9 a través del microscopio confocal, se comprueba que se localiza en el núcleo celular actuando como un posible FT.

Objetivos específicos:

- Clonar *AtTGA9* y estudiar la presencia y localización subcelular de FaTGA9 y AtTGA9 a través de infiltración en hoja de *Nicotiana benthamiana*.
- Poner a punto la amplificación por PCR de los promotores objetivos p19, p25 y p26 para la posterior clonación y estudio de la interacción FT-promotor.



3. MATERIAL Y MÉTODO

3. 1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de *F. x ananassa*, utilizado para la clonación de promotores, se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. Se pesaron alrededor de 120 mg de hojas jóvenes y se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente se añadieron 600 μ L de tampón de extracción compuesto por CTAB al 2% (m/v), PVP-40 al 2% (m/v), NaCl a 1,5 M, Tris pH 8 0,1 M, EDTA 0,025 M y β -mercaptoetanol al 0,5% (v/v). Las muestras con el tampón de extracción se incubaron 30 min. a 65°C y después se hicieron 4 extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando las muestras a 11.000 r.p.m. 10 min. y recuperando el sobrenadante en todos los casos. El ADN genómico se precipitó añadiendo $\frac{2}{3}$ del volumen de isopropanol y centrifugando 2 veces durante 15 min. a 14.000 r.p.m., lavando con etanol 70% entre ellas. El pellet se resuspendió en 100 μ L de agua Mili-Q. El ADN se cuantificó en el nanodrop, y su calidad se analizó en un gel de agarosa.

3. 2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción del ARN de Arabidopsis, usado para la clonación del *AtTGA9*, se realizó siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Se aislaron raíces de Arabidopsis de 3 semanas que habían pasado 1 semana a 4°C y radículas de plántulas germinadas de 1 semana que habían estado 3 días a 4°C, se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido y en un eppendorf con un pistilo respectivamente. Se pesaron 150 mg de raíces y 30 mg de radículas y se añadió en torno a 500 μ L de tampón de extracción compuesto por Tris pH 8 0,2 M, LiCl 0,4 M, EDTA pH 8 25 μ M y SDS 1% (m/v). Inmediatamente después, a la muestra con el tampón de extracción, se le añadió el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se centrifugó 10 min. (todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C y a máxima velocidad). Se repitió el proceso de lavado una segunda vez. Seguidamente, una décima parte del volumen de la muestra fue añadida como acetato sódico 3M, para luego añadir 2,5 veces del volumen resultante, de etanol absoluto frío. El ARN se dejó precipitar en hielo y se centrifugó 20 min. El pellet resultante se resuspendió en 100 μ L de agua destilada y se le



añadió el mismo volumen de LiCl, para volverlo a dejar precipitar. Posteriormente, el ARN se centrifugó 2 veces durante 15 min., lavando con etanol 70% frío entre ellas. Finalmente el ARN se resuspendió en 20 µL de agua Mili-Q y se cuantificó en el nanodrop.

Para eliminar el ADN residual se utilizó la enzima Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific AM2238) junto con el 10X Turbo DNase Buffer. El ARN se incubó 30 min. a 37 °C, y posteriormente se retiró la DNasa mediante extracción con cloroformo:alcohol isoamílico, seguido de una precipitación con acetato sódico y etanol. Una vez tratado este ARN, se cogió 1 µg para la síntesis de ADNc, para el cual se usó el iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad 1708890). El programa usado constaba de un paso de 5 min. a 25°C para el alineamiento de los primers aleatorios, un segundo paso de 20 min. a 46°C para la transcripción reversa, y finalmente un tercero de 1 min. a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa.

3. 3. Amplificaciones por PCR

Primer	Código	Secuencia
pFxaC_19g00020_XhoI_Fw	p19_1.0_Fw	TATCTCGAGGGTGGTGATTGTTGATTGTTCCG
pFxaC_19g00020_PstI_Rv	p19_1.0_Rv	GAGCTGCAGCAGTAACAGATTAAGTAACTGACG
pFxaC_26g27290_XhoI_Fw	p26_1.0_Fw	GACCTCGAGGAGAAGCAAGCTATCACAC
pFxaC_26g27290_PstI_Rv	p26_1.0_Rv	TTTCTGCAGCTTTCTTGAATCAAAGTAACTGAC
pFxaC_25g16410_ApaI_Fw	p25_1.0_Fw	TGAGGGCCCGCTAAATGTACATGACCTTAACC
pFxaC_25g16410_PstI_Rv	p25_1.0_Rv	GACCTGCAGTATCTTGCCGTGTCGAACAAAC
pFxaC_19g00020_BamHI_Fw	p19_2.1_Fw	TATGGATCCGGTGGTGATTGTTGATTGTTCCG



pFxaC_19g00020_NcoI_Rv	p19_2.1_Rv	GAGCCATGGCAGTAACAGATTAAACTGACG
pFxaC_25g16410_HindIII_Fw	p25_2.1_Fw	TGAAAGCTTGCTAAATGTACATGACCTTAACC
pFxaC_25g16410_BamHI_Rv	p25_2.1_Rv	GACGGATCCTATCTTGCCGTGTCGAACAAAC
pFxaC_26g27290_BamHI_Fw	p26_2.1_Fw	GACGGATCCGAGAAGCAAGCTATCACAC
pFxaC_26g27290_NcoI_Rv	p26_2.1_Rv	TTTCCATGGCTTTCTTGAATCAAACCTGCAC
pFxaC_19g00020_Fw	p19_2.0_Fw	CATCTGCTGGTGGAGCAAGC
pFxaC_19g00020_Rv	p19_2.0_Rv	GAAGCTAAATTTGGACCCTGACC
pFxaC_25g16410_Fw	p25_2.0_Fw	CGCACATAACCATGCACCATGG
pFxaC_25g16410_Rv	p25_2.0_Rv	CTGACAATCCGCCGACTTGTG
pFxaC_26g27290_Fw	p26_2.0_Fw	GAGCCCTAAGTTTGCTATCTGTC
pFxaC_26g27290_Rv	p26_2.0_Rv	CCTCGAGGCCTCAGCACGC

Tabla 1. Nombre de los primers utilizados para clonar los promotores de *F. x ananassa*, acompañados del código con el que serán referidos en el texto y su secuencia.

Para facilitar la referenciación, el promotor de *ATG8F* (pFxaC_19g00020) será nombrado como p19, y los promotores de 2 homeólogos de *ATG8G* (pFxaC_25g16410 y pFxaC_26g27290) serán nombrados como p25 y p26 respectivamente.

Los primers referenciados con el código 1.0 son los primers utilizados inicialmente para clonar los promotores de *F. x ananassa*. Sin embargo, como se verá en los resultados no generaron amplificación suficiente. Por tanto se procedió a utilizar unos nuevos, los cuales amplifican una zona mayor del genoma y son referenciados con un 2.0 en el código. El

resultado de la amplificación con estos primers 2.0, fue reamplificado por los primers finales los cuales se nombran con el código 2.1.

3.3.1. PCRs de baja fidelidad con GoTaq

Tanto para la optimización de la temperatura de alineamiento para la amplificación con iProof, como para las PCRs de las colonias, se ha usado la enzima GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega).

Para realizar las PCRs sobre colonia, se picó con un palillo estéril una colonia y se resuspendió en 15 μ L de agua Mili-Q. La mezcla se incubó 5 min a 95°C. Posteriormente se añadió 10 μ L de la mezcla de reacción de PCR que presentaba los siguientes componentes: 1,25 u de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase, 1x Colorless GoTaq Flexi Buffer, los primers a 0,5 μ M, PCR Nucleotide Mix a 0,2 mM cada dNTP y $MgCl_2$ a 1 mM. Para las PCRs se utilizó un programa de 5 pasos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un primer paso de 2 min. a 95°C para la desnaturalización inicial, un segundo de 30 s. a 95°C para la desnaturalización al inicio de cada ciclo, un tercero de 30 s. a la temperatura adecuada de los primers para el alineamiento, un cuarto de 2 min. 20 s. a 72°C de extensión en el ciclo, y por último 5 min. de extensión final también a 72°C. Realizando 35 ciclos de repetición comprendiendo los pasos 2,3 y 4.

Para la optimización de la temperatura de alineamiento de los primers usados en la amplificación de los promotores de *F. x ananassa*, la mezcla de reacción preparada fue la misma que para las PCRs de las colonias, a excepción de que se usó 150 ng de ADN. El programa en este caso es similar al anterior diferenciándose en que se hicieron gradientes de temperatura en los 30 s. de alineamiento. Se probó el rango 63,5°C - 55°C para los primers p19_1.0 y el rango 55°C - 45°C para los primers p19_1.0, p25_1.0 y p26_1.0.

3.3.2. PCRs de alta fidelidad con iProof

Respecto a las PCRs usadas para amplificar tanto los promotores de *F. x ananassa* como el de Arabidopsis, y el FT de Arabidopsis usamos la iProof High-Fidelity PCR Master Mix (BioRad). El FT de *F. x ananassa* ya se encontraba aislado e insertado en un plásmido. El mix de la enzima se usó a la concentración indicada en las instrucciones del fabricante al igual que se hizo con la concentración de los primers, llevado a un volumen final de 25 μ L (lo mencionado se mantuvo así en todas las PCRs de alta fidelidad).

Para la amplificación de *AtTGA9*, aparte de las concentraciones anteriores que se mantuvieron estándar, se tomó 1 μ L el ADNc obtenido a partir del ARN de raíces/radículas de Arabidopsis. En cuanto al programa, estaba compuesto por 5 pasos. El inicial de 3 min. a 98°C, seguido de otro de 10 s. a 98°C. Un tercero de 1 min. a 65°C y cambiado posteriormente a 60°C con los nuevos primers. El cuarto de 2 min. a 72°C, y un final de 5 min. a 72°C. Se realizaron 35 ciclos comprendiendo los pasos 2,3 y 4.

La reamplificación de *TGA9* de Arabidopsis se realizó empleando el mismo programa de PCR y mezcla de reacción que el descrito en el párrafo anterior pero usando como molde un microlitro del amplicón de *TGA9* purificado de la PCR anterior y con una temperatura de alineamiento de 63°C.

Para la amplificación de los promotores de *F. x ananassa*, las concentraciones del mix de iProof y de primers se mantuvieron constantes. Sin embargo, la cantidad de ADN genómico, la concentración de $MgCl_2$ y el programa utilizado se fue variando. Las condiciones óptimas se especificarán en el apartado de resultados.

En relación a las reamplificaciones de los promotores de *F. x ananassa*, la composición de la mezcla de reacción fue la siguiente. Mix de iProof y primers a concentración estándar, cantidad del inserto clonado purificado entre 10-20 ng y $MgCl_2$ a 1,5 mM. En relación al programa de las PCRs estaba formado por 4 pasos: el primero de 3 min. a 98°C, el segundo de 30 s. a 98°C, el tercero siendo una etapa conjunta de alineamiento y extensión de 3 min. 40 s. a 65°C, y un último de 7 min. a 65°C. Se realizaron 35 ciclos que englobaban a los pasos 2 y 3.

La comprobación de los resultados de todas las PCRs se llevó a cabo realizando electroforesis en geles de agarosa 0,8% en TAE 1x, obteniendo las imágenes con el equipo ChemiDoc



XRS+ (BioRad) y el uso de su programa. La purificación de las bandas en estos geles se realizó con el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, con una variación al final. Se hicieron 3 pasos de elución para aumentar el rendimiento de las purificaciones ya que inicialmente salían concentraciones y rendimientos bastante bajos además de tener una banda poco intensa.

3.4. Clonaciones

3.4.1 Clonación de *TGA9* en el vector final

La recombinación BP para incorporar el *TGA9* de Arabidopsis al vector pDONR Zeo se realizó dejándola toda la noche a 25°C. La mezcla de reacción estaba compuesta por 22 ng de inserto y 150 ng de pDONR, además del tampón TE pH 8 y la BP clonase del Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). Añadiendo la mitad de la BP clonasa en la última hora de la reacción para dar un impulso final, siendo el volumen total de la mezcla de reacción de 11 µL. Finalizada la incubación se le añadió 1 µL de proteinasa K a la mezcla de recombinación y se incubó 10 min. a 37°C para inactivar la clonasa.

Se usó la cepa de *E. coli* Top10 competentes de choque térmico para transformar el resultado de la recombinación. El procedimiento seguido se describe a continuación. Se usaron de 2 a 3 µL del plásmido resultante para transformar las bacterias. Se dejaron 20 min. en hielo y se les dió un choque térmico poniéndolas a 42°C durante 30 s. Posteriormente, se les añadió 900 µL de LB líquido y se incubaron a 37°C durante 1 h. para su proliferación. Luego se pasaron a placas de cultivo de LB sólido con presencia del antibiótico al cual el plásmido incorporado confería resistencia, actuando así como medio de selección. Las colonias crecidas se confirmaron por PCR sobre colonia y posterior secuenciación.

La recombinación LR se utilizó para incorporar el *TGA9* de *F. x ananassa* y el de Arabidopsis (ambos recombinados en respectivos pDONR Zeo) en el vector final, que en este caso era el vector binario pB7WGF2. La cantidad del plásmido con inserto usado fue de 150 ng en ambos casos y 50 ng para el vector final. Además, se usó el tampón TE pH 8 y LR clonase del Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen), llegando a un volumen final de 12 µL. La recombinación LR se llevó a cabo durante 1 h. a 25°C en un termociclador. La



incorporación de la construcción pB7WGF2-*TGA9* correspondiente se confirmó mediante PCR sobre colonia.

3.4.2. Clonación de los promotores

El intento de clonación de los promotores p19, p25 y p26 de manera independiente en el plásmido pGreen II-0800-Luc se hizo a través del uso de enzimas de restricción, digiriendo tanto los amplicones como el plásmido, y ligando posteriormente. La mezcla de digestión de p19 y p26 estaba compuesta por la mezcla de los eluidos del promotor, tampón R 1x , enzima Pst I y Xho I (Thermo Fisher Scientific) a las mismas unidades/microlitro y agua. La mezcla de digestión de p25 estaba compuesta por la mezcla de los eluidos, tampón B 1x , enzimas Pst I y Apa I (Thermo Fisher Scientific), estando la primera al doble de unidades/microlitro que la segunda para un correcto funcionamiento, y estando Apa I a las unidades que recomendaba el fabricante y agua. La digestión se realizó en eppendorfs en placa calefactora durante 2 h. a 37 °C.

Posteriormente, se purificaron los productos de las digestiones para eliminar los residuos producidos, a través del protocolo descrito a continuación. Se le añadió al eppendorf un décimo del volumen de acetato sódico 3M pH 5,2, seguido de 2,5 veces de etanol del volumen presente . Se dejó enfriar a -80 °C durante 30 min y se centrifugó 2 veces, 30 y 15 min. a 4°C, a máxima revolución, lavándose el pellet con EtOH 70% entre ellas. Se dejó secar 15 min. a 37°C, y se resuspendió en 10 µL de agua.

El pGreen se extrajo de un stock bacteriano con el plásmido incorporado usando Favorprep Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen) y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (al igual que todas las extracciones de plásmidos a partir de cultivos bacterianos). Se hicieron 2 mezclas de digestión de pGreen debido al uso de diferentes enzimas. Ambas estaban compuestas por el eluido del plásmido y agua. Encontrando en la primera, tampón R 1x y enzimas Pst I y Xho I (Thermo Fisher Scientific), ambas en la misma proporción, a las unidades/microlitro que recomendaba el fabricante. Encontrando en la segunda, tampón B 1x y enzimas Pst I y Apa I (Thermo Fisher Scientific), estando la primera al doble de unidades/microlitro que la segunda para un correcto funcionamiento y estando Apa I a las unidades que recomendaba el fabricante. La digestión se realizó en eppendorfs en placa



calefactora durante 4 h. a 37°C en la primera ocasión y en estufa a 37°C toda la noche para el resto de veces, añadiendo para los últimos 10 minutos enzima CIP (CutSmart) para desfosforilar los extremos 5' del plásmido y evitar la propia ligación. Poniéndola finalmente a 80 °C 2 minutos para inactivar esta enzima.

La mezcla de la ligación se compuso de todo el eluido del promotor digerido y purificado (10 µL, máxima cantidad disponible), 1 µL de vector pGreen digerido y purificado (la cantidad se comentará en los resultados), tampón de la enzima T4 DNA ligasa 1x , T4 DNA Ligasa (Promega) a las unidades recomendadas por el fabricante y agua hasta completar 15 µL. La ligación se dejó 1 h. a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C.

Posteriormente, el resultado de la ligación se comprobó inicialmente transformando *E. coli* Top10 de choque térmico y por segunda vez en *E. coli* Top10 electrocompetentes. Incubando las bacterias transformadas 1 h. a 37 °C y posteriormente sembrando en placas de cultivo de LB sólido con kanamicina 50, para seleccionar las bacterias que incorporaron el plásmido.

3.5. Transformación en *Agrobacterium* e infiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

Las construcciones pB7WGF2-*FaTGA9* y pB7WGF2-*AtTGA9* se transformaron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*) GV3101. La transformación se llevó a cabo de la siguiente forma: Se le añadieron a las bacterias electrocompetentes 20 ng de plásmido purificado. Se le aplicó un choque eléctrico con el Gene Pulser (BioRad) a 2,5 kV de voltaje, 25 µF de capacitancia y 400 Ω de resistencia. Posteriormente, se le añadió rápidamente 900 µL de LB líquido y se dejó en la incubadora de 28°C durante 2 h. Se cultivó posteriormente en placas de LB sólido más antibióticos durante 2-3 días.

Se sembró *Agrobacterium* cogido de un stock y ya transformado con el plásmido P19 (que inhibe el silenciamiento en *N. benthamiana* cuando se sobreexpresa un gen) en una placa de selección, para obtener una buena cantidad de biomasa. Se hizo lo mismo con cada construcción anterior de *TGA9*, cogiendo y extendiendo 1 de las colonias crecidas y dejándose otros 2 días a 28°C. El día anterior a la infiltración se lanzaron cultivos líquidos en Erlenmeyer, cogiendo biomasa del último cultivo en placas, en presencia de los antibióticos correspondientes y dejándolos en la incubadora a 28°C toda la noche.



El día de la infiltración se centrifugaron los cultivos a 2200 g durante 20 min. y se resuspendió en 10 mL de tampón de agroinfiltración, compuesto por MgCl₂ 10 mM, MES pH 5,6 10 mM y Acetosiringona 100 µM. Se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm haciendo blanco con el tampón, y se diluyó el cultivo para que la densidad óptica fuese menor que 1 para cada construcción. Finalmente, se prepararon 10 mL de solución con unas densidades ópticas de 0,7 para la construcción de *TGA9* de Arabidopsis y 0,3 para el plásmido P19 dando una densidad óptica final de 1. De igual manera se hizo para la mezcla de la construcción de *F. x ananassa* y el plásmido P19.

En nuestro caso, se cogieron plantas de *N. benthamiana* de 3 semanas desde su trasplante crecidas en condiciones de día largo, 21°C y 65% de humedad. Se infiltraron las 2 hojas más grandes de cada planta con una jeringa de 1 mL sin aguja, haciendo presión en el envés hasta que la mayoría de la hoja estuviera infiltrada con la solución y etiquetando posteriormente. Se infiltraron 2 plantas con la construcción de Arabidopsis y 3 con la construcción de *F. x ananassa*. Una vez hecho esto, se dejaron 3 días en las mismas condiciones de crecimiento.

3.6. Observación en el Microscopio confocal

Para su observación en el microscopio confocal se cogieron 2 trozos de forma circular con un sacabocados de las hojas infiltradas con mejor aspecto de cada construcción. Se pusieron en un portamuestras con el envés hacia arriba, se les echó agua Mili-Q por encima, tapando posteriormente con un cubre muestras (Menzel-Gläser) de 1,5 de apertura numérica.

El microscopio confocal usado fue un LSM 880 (Zeiss), se midió la fluorescencia de la proteína GFP excitando con un láser a 488 nm y sabiendo que emite a 508 nm se recogió el espectro abarcando desde 500 a 530 nm. Para excitar la clorofila se incidió con un láser a 561 nm y sabiendo que emite el pico de fluorescencia a 682 nm se recogió el espectro abarcando desde 610 a 750 nm. Para localizar e identificar los orgánulos requeridos se usaron lentes de 20 y 40 aumentos, y para obtener las imágenes se usó el programa proporcionado por la empresa fabricante del microscopio.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de TGA9 de *F. x ananassa* y de Arabidopsis en *Nicotiana benthamiana*

4.1.1 Estudio de identidad entre AtTGA9 y FaTGA9

Se realizó el alineamiento de la proteína TGA9 de Arabidopsis (AtTGA9) con la de *Fragaria vesca* (FvTGA9) y con los homeólogos que presentan mayor similitud de *F. x ananassa* (FaTGA9.1, FaTGA9.2, FaTGA9.3 y FaTGA9.4) con el programa CLUSTAL Omega. Como se puede observar en el Anexo 1, las FaTGA9 tienen una secuencia de aminoácidos bastante similar a la de AtTGA9, sobre todo en el dominio b-ZIP, esto apoya la hipótesis de que podrían tener funciones parecidas. Datos previos de expresión de *FaTGA9* a lo largo de la maduración de la fresa indicaban que el patrón de expresión de FaTGA9.1 podría correlacionarse con la expresión de *genes ATG8*, por este motivo se seleccionó FaTGA9.1. También se ha añadido la predicción de la estructura proteica de AtTGA9 según Alphafold (Anexo 1).

4.1.2. Análisis bibliográfico de expresión de TGA9, extracción de ARN y síntesis de ADN copia

Para usarlo como control en el experimento de localización subcelular y dado que *FaTGA9* ya estaba clonado en el laboratorio, se decidió que parte de este trabajo fuese clonar *AtTGA9*. *AtTGA9* se ha demostrado que actúa como FT regulando la expresión de otros genes. Además, es una proteína que no se expresa en la misma cantidad en todas las partes de Arabidopsis ni de igual manera en todas las condiciones. Como primer paso, se realizó un búsqueda bibliográfica sobre cuáles serían las mejores opciones a nuestro alcance para obtener el ARN para posteriormente convertirlo en ADNc.

Como se ve en la Figura 4, la expresión de *AtTGA9* se ve principalmente localizada en la radícula y en la raíz mientras que en las hojas la expresión se ve bastante mermada. En este estudio, se tenía disponibles plántulas y plantas jóvenes de Arabidopsis estresadas por el frío en su crecimiento. En la Figura 4 b, se observa que la exposición a bajas temperaturas no



acaba afectando negativamente a la expresión de TGA9 en la raíz. Por tanto, se optó por seleccionar las raíces y radículas de esas plantas a las que se tenía acceso en el laboratorio para extraerles el ARN.

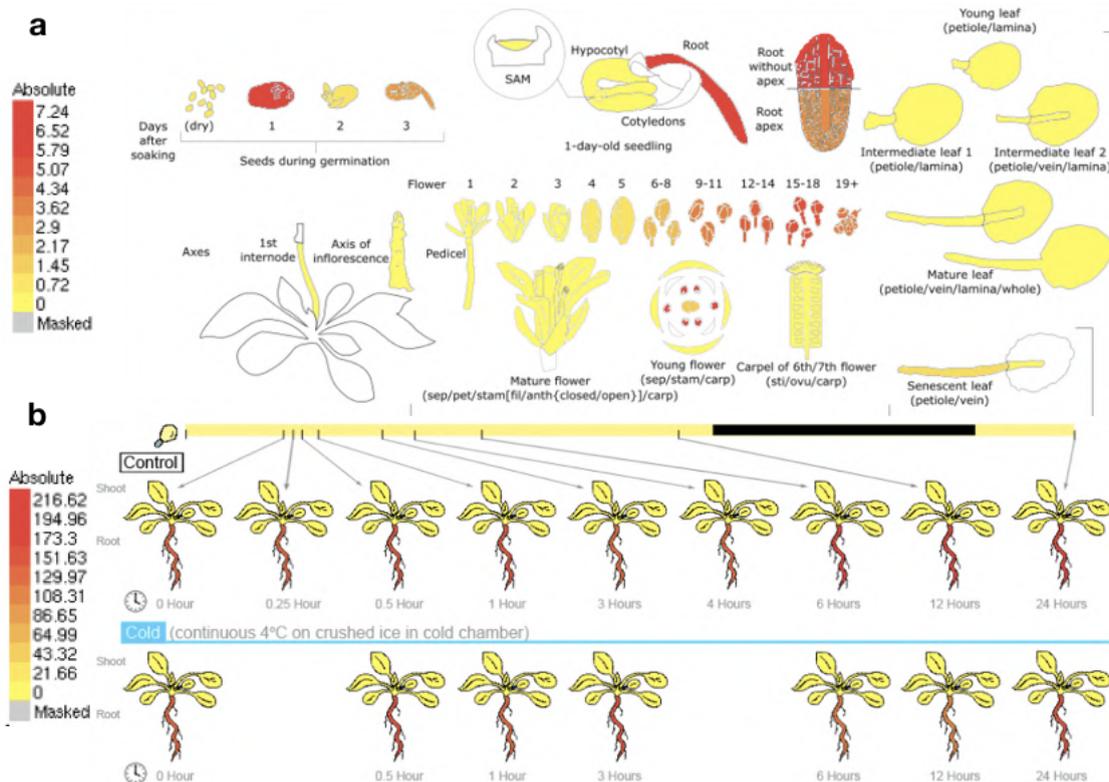


Figura 4. Localización y expresión de TGA9 en Arabidopsis indicado a través de una escala colorimétrica absoluta. **(a)** Atlas Klepikova que muestra el grado de expresión del FT en las partes de la semilla y planta con el paso de los días. **(b)** Comparación de expresión en planta estresada por frío respecto a la planta control. Imágenes extraídas de www.arabidopsis.org.

El ARN purificado tenía unos valores de absorbancia 260/280 igual a 2,01 y absorbancia 260/230 igual a 2,47 para el extraído de radículas y valores respectivos de 2,08 y 2,21 para el ARN extraído de raíces jóvenes. Finalmente, se utilizó 1 µg de cada uno para sintetizar el correspondiente ADNc.

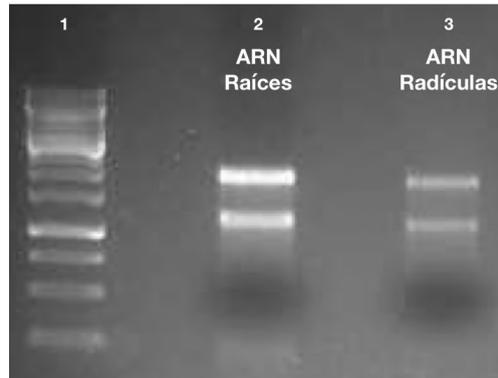


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calle 3 para el ARN extraído de raíces y calle 5 para el ARN extraído de radículas.

4.1.3. Amplificación de *TGA9*

La amplificación de *TGA9* de *Arabidopsis* se hizo en 2 pasos. Los primeros primers presentaban las regiones attB incompletas y las secuencias específicas del FT, mientras que la segunda PCR para reamplificar se hizo con primers que presentaban las regiones attB completas para la posterior recombinación BP.

Se usó 1 μ L de ADNc de cada extracción para realizar la amplificación de *TGA9* con las condiciones de PCR descritas en material y métodos en el apartado 3.3.2. En este caso, solo se obtuvo la banda de la amplificación a partir de raíces. La reamplificación posterior de esta banda salió correctamente, obteniendo el *AtTGA9* listo para la clonación.

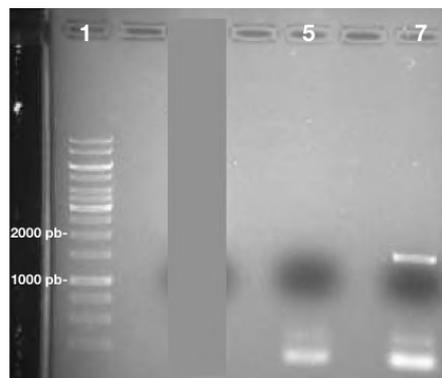


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calle 5 para la amplificación de *TGA9* a partir del ADNc de radículas (sin resultado) y calle 7 para la amplificación de *TGA9* a partir del ADNc de raíces.

4.1.4. Inclusión en el vector final

El amplicón de *TGA9* se introdujo en el vector final a través de la clonación Gateway. Para ello, el amplicón primero se introdujo en el pDONR Zeo a través de recombinación BP. Una vez completada, se transformaron *E. coli* Top10 competentes de choque térmico para comprobar el resultado de la clonación y obtener una mayor cantidad del producto.

Las PCRs de colonias indicaron que la mayoría de nuestros clones habían incorporado nuestro vector. Una vez comprobado, se procedió a la extracción del plásmido y su posterior secuenciación que confirmó que la secuencia de *AtTGA9* estaba completa y era correcta.

A continuación, se realizó la recombinación LR para obtener nuestro insertos de *TGA9* tanto de *Arabidopsis* como de *F. x ananassa* en el plásmido final de manera independiente. Se intentó clonar por recombinación en el vector pGWB6, sin embargo, no se obtuvieron transformantes. Esto pudo ser porque el plásmido, perteneciente a la primera generación de vectores gateway, necesitaba ser digerido para ser linearizado y poder hacer la LR. Finalmente, se usó pB7WGF2 como plásmido final para albergar el *TGA9*. Una vez obtenido los clones transformados, se realizó PCR sobre colonias que permitió confirmar la presencia del inserto. Posteriormente, se lanzó cultivo líquido de los clones positivos con el objetivo de hacer miniprep y obtener plásmidos aislados con los que transformar *Agrobacterium*. El procedimiento realizado en la recombinación BP y LR se describe en el apartado 1.4 de material y método.

4.1.5. Transformación en *Agrobacterium* e infiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*

Para la posterior introducción de los FT en *N. benthamiana*, se transformó *Agrobacterium* electrocompetente GV3101 con los plásmidos de manera independiente. El procedimiento y los detalles de la transformación e infiltración se encuentran descritos en el apartado 3.5 de material y método.





Figura 7. Plantas de *N. benthamiana* que contienen hojas infiltradas con *Agrobacterium*. (a) 3 plantas infiltradas con la construcción de *F. x ananassa*. (b) 2 plantas infiltradas con la construcción de Arabidopsis

Con las cepas de *Agrobacterium* transformadas, se infiltraron plantas de *N. benthamiana* por el envés de la hoja, usando las 2 hojas más grandes de cada planta. Obteniendo 2 plantas infiltradas con la construcción de Arabidopsis y 3 con la construcción de *F. x ananassa*. Algunas de las hojas infiltradas se encontraban en un estado de salud mermado (Figura 7), especialmente las infiltradas con el *TGA9* de *F. x ananassa*. Esto pudo ser debido a la falta de práctica ya que se infiltró por varios puntos de la hoja para que quedase completamente infiltrada.

4.1.6. Observación en el microscopio confocal.

Para el estudio de los FT en el microscopio confocal, se cortaron trozos circulares de las hojas de las zonas en mejor estado. La localización del FT TGA9 es posible debido a la fusión de este a la proteína GFP en su extremo N-terminal, la cual emite fluorescencia después de ser excitada por un láser a 488 nm. También se recogieron en las imágenes la fluorescencia de la clorofila en color rojo.

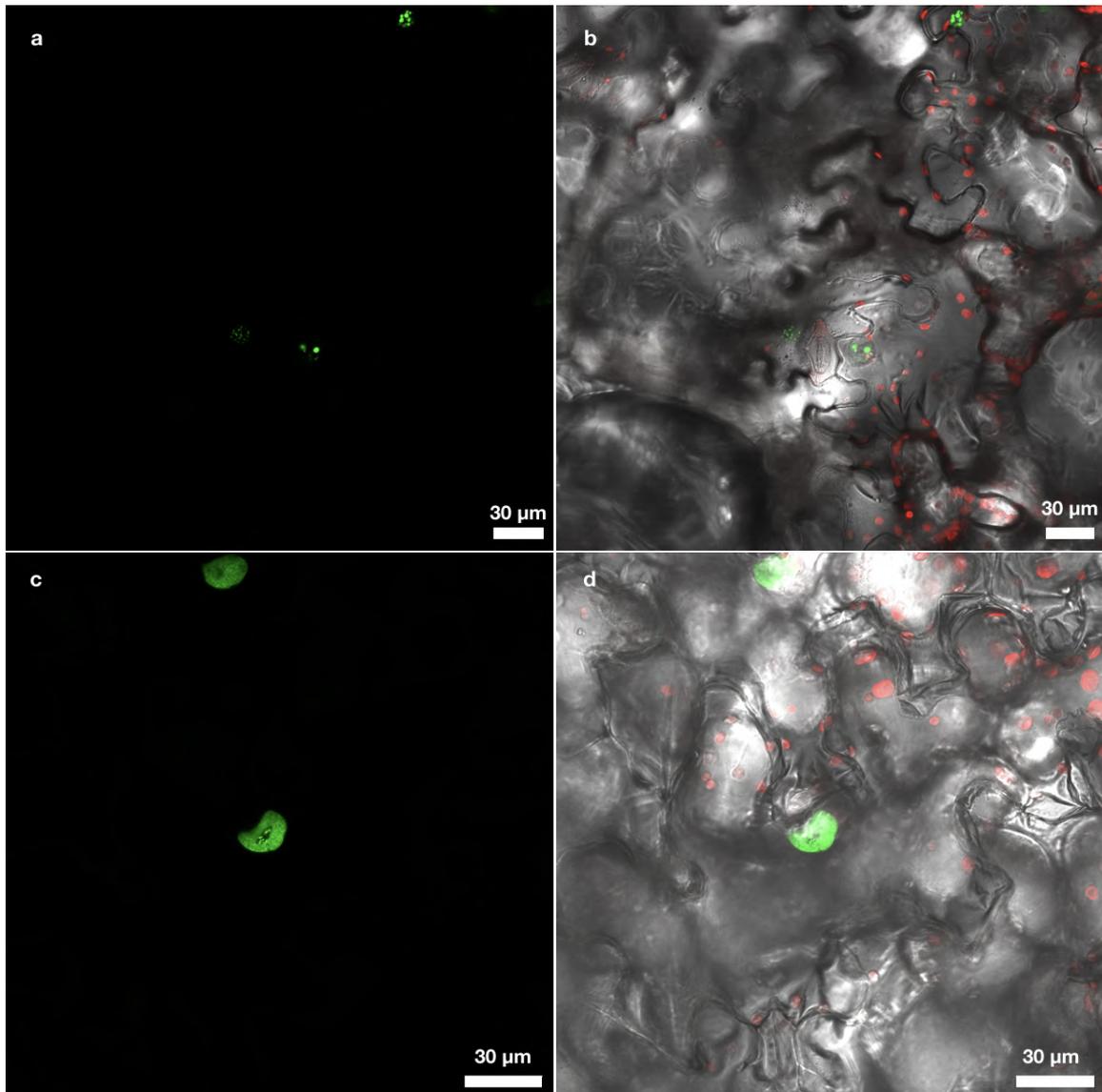


Figura 8. Imágenes obtenidas a través del microscopio confocal. Imágenes a y b de hojas infiltradas con *AtTGA9*. Imágenes c y d de hojas infiltradas con *FaTGA9*. (a) Componente GFP de la imagen de varios núcleos. (b) Imagen de varios núcleos obtenida sumando la luz transmitida (escala de grises), la fluorescencia de GFP (verde) y de la clorofila (roja). (c) Componente GFP de la imagen de varios núcleos. (d) Imagen de varios núcleos obtenida sumando la luz transmitida (escala de grises), la fluorescencia de GFP (verde) y de la clorofila (roja).

Como se observa en la Figura 8, el FaTGA9 se localiza en el núcleo al igual que AtTGA9 como es lógico al ser este último un FT, por lo que se puede tomar como una confirmación de nuestra hipótesis de que FaTGA9 puede ser un FT. Sin embargo, se denotan diferencias entre el de *F. x ananassa* y el de *Arabidopsis*, distribuyéndose el primero de manera más homogénea por el núcleo mientras que el segundo se encontraba más agrupado en estructuras parecidas a esferas o anillos (Figura 9).

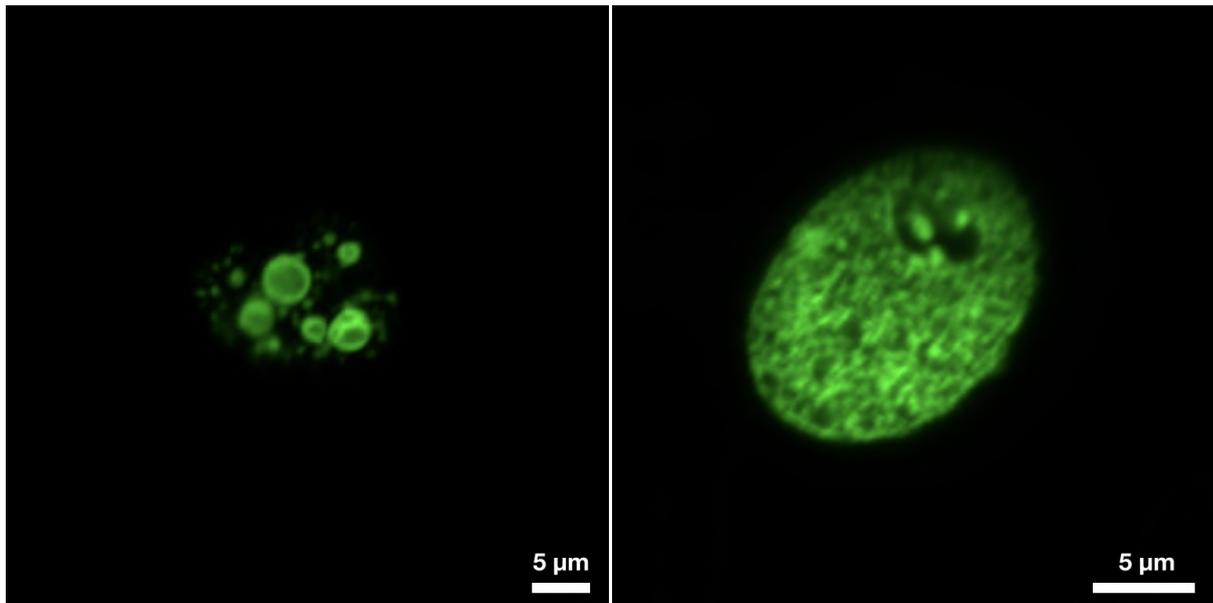


Figura 9. Distribución y localización de ambas proteínas en el núcleo. La imagen de la izquierda representa al factor AtTGA9 mientras que la de la derecha representa a FaTGA9.

4.2. Puesta a punto de PCRs y clonación de promotores

4.2.1 Análisis de promotores de posibles dianas de FaTGA9

Esta investigación se ha centrado en la relación entre un homeólogo del FT TGA9, y los promotores de 2 homeólogos de *ATG8G* y 1 homeólogo de *ATG8F* de *F. x ananassa* (Figura 10), ya que son aquellos que en estudios anteriores presentan un patrón de expresión opuesto a lo largo del desarrollo, siendo la expresión de *FaATG8G* más elevada en fruto verde disminuyendo hacia fruto rojo y la de *FaATG8F* más baja en fruto verde aumentando hacia fruto rojo (Sánchez-Sevilla et al. 2021).

Como se puede ver en la Figura 10, los promotores de los 3 genes presentan más de una copia de la secuencia de unión de TGA9 descrita en Arabidopsis (TGACG), lo cual indica que podrían ser verdaderas dianas de FaTGA9 en fresa. Para poder determinar experimentalmente si *FaATG8G* y *FaATG8F* eran dianas de FaTGA9 se procedió a intentar clonar sus secuencias promotoras.

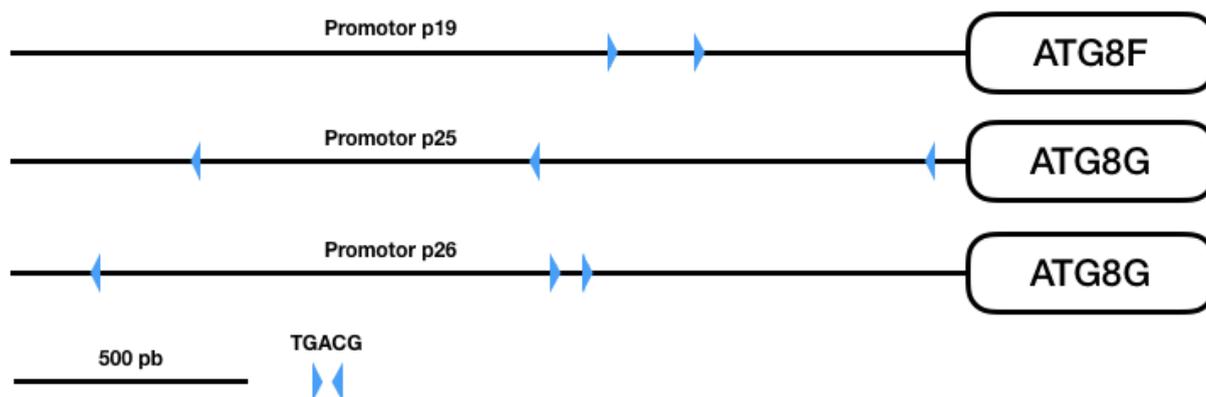


Figura 10. Diagrama esquemático de la región de los promotores de *ATG8F* (pFxaC_19g00020 nombrado como p19) y *ATG8G* (pFxaC_25g16410 y pFxaC_26g27290 nombrado como p25 y p26 respectivamente) (~2000 pb desde el codón de inicio). La secuencia diana del TGA9 (TGACG) está representada a través de triángulos azules, y su dirección indica el sentido de la cadena en la que se encuentra.

4.2.2. Extracción de genómico y comprobación de su calidad

Se realizó la extracción de genómico a partir de 2 muestras de hoja macerada de *F. x ananassa* siguiendo el protocolo descrito en Material y métodos 3.1. Posteriormente se realizaron PCRs de alta fidelidad con iProof para los primers de p19, p26 y otra con los primers del gen *APETALA3* de *F. x ananassa*, usado en el laboratorio receptor como control positivo de la PCR. Se usó el genómico I en una cantidad de 150 ng para todas las PCRs. El programa usado estaba constituido por un paso inicial de 3 min. a 98°C, un segundo de 10 s. a 98°C, un tercero de 15 s. a 65°C para p19 y p26, y a 56°C para los de *APETALA3*. Un cuarto de 1 min. a 72°C, y uno final de 5 min. a 72°C, realizando 35 ciclos comprendiendo los pasos 2,3 y 4. Se comprobó corriendo en un gel de agarosa la calidad de los genómicos, y los resultados obtenidos de la PCRs.

No salió ninguna banda para las PCRs, lo cual fue indicativo de que algo no estaba funcionando como se esperaba, ya que la PCR de amplificación de *APETALA3* tampoco obtuvo resultado (Figura 11). Se comprobó si la cantidad de genómico usada no había sido la óptima, probando en otra PCR con cantidades superiores (300 ng) e inferiores (50 ng) con los primers de *APETALA3* y p19, ajustando a un volumen final de 20 µL. En este caso tampoco se obtuvo ninguna banda (datos no mostrados).

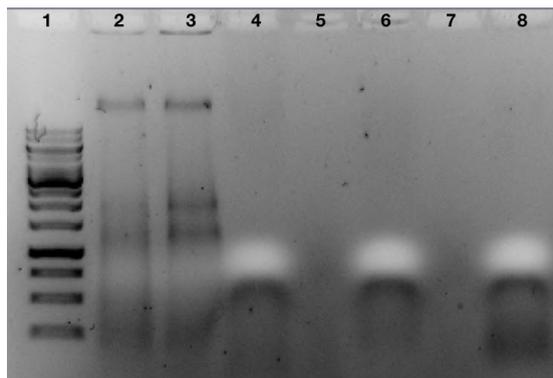


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calles 2 y 3 para los genómicos I y II respectivamente, calle 4,6 y 8 para los productos de la PCR de *APETALA3*, p19 y p26 respectivamente.

Se procedió, entonces, a repetir la extracción del genómico de *F. x ananassa*, añadiendo 2 pasos más de extracción con cloroformo, por si las impurezas fuesen la causa de que no se obtuviera el resultado esperado. En este caso, los valores obtenidos de los parámetros A260/280 y A260/230 fueron 1,96 y 1,66 respectivamente, unos valores aceptables que eran indicativos de una buena calidad del ADN genómico extraído.

Con 150 ng de este nuevo genómico se realizó una PCR de baja fidelidad con la enzima Gotaq, para los primers de *APETALA3* y p19. Usando las mismas condiciones que las descritas para estudiar la temperatura de alineamiento óptima, probando en este caso 56°C para *APETALA3* y 65°C para p19. Aquí sí se vieron bandas para la PCR de *APETALA3*, indicativo del buen funcionamiento de la PCR y de las buenas condiciones del ADN genómico, pero no para la de p19.

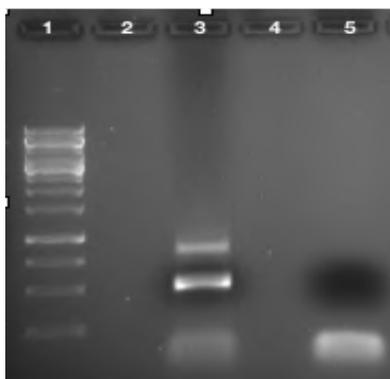


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calle 3 y 5 para el producto de la PCR de *APETALA3* y p19 respectivamente.

4.2.3. PCR de baja fidelidad para optimizar la Temperatura de alineamiento

Después de esto, se realizaron PCRs usando gradientes de temperatura para el p19 entre 63,5°C y 55°C, las cuales se encontraban alrededor de la temperatura de alineamiento teórica óptima, pero no se obtuvo resultado. También, se probó con un rango de temperaturas más bajas, entre 55°C y 45°C, para los primers de p19, p25 y p26. No se obtuvo resultado para ninguno a excepción del rango de temperaturas más bajas, entre 50°C y 45 °C, para los primers de p25.

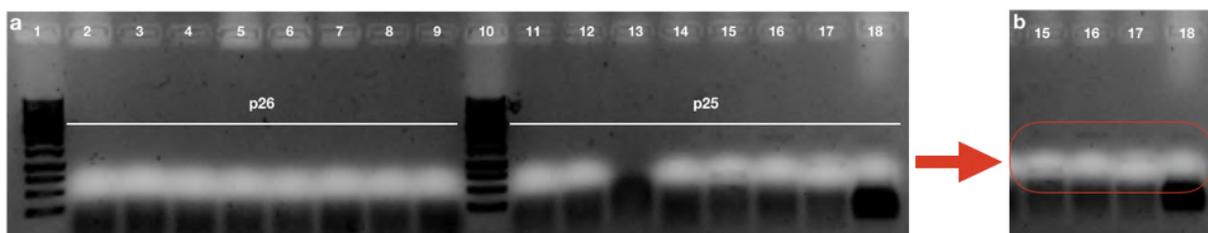


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa. (a) Calles 1 y 10 para el patrón, calles 2-9 para el gradiente desde 55°C hasta 45°C del p26, y calles 11-18 para el gradiente desde 55°C hasta 45°C del p25. (b) Ampliación de la Figura 13 a, donde se pueden observar diferentes bandas de poca intensidad de p25 en las calles de 48,9°C, 47°C, 45,6°C y 45°C.

Sin embargo al ser unas temperaturas tan bajas y usar una enzima de baja fidelidad, no se tiene la fiabilidad de que la banda que aparece a la longitud buscada sea el amplicón deseado. Después de esto, se realizó una PCR de alta fidelidad con iProof con el mismo programa que las primeras PCRs usadas para comprobar la calidad del ADN genómico, a excepción de usar 47°C como temperatura para el alineamiento de los primers de p25 y un volumen final de 50 μ L. Esta vez sí salió banda pero a una altura indeseable, de 750 pares de bases, en vez de 2000 pares de bases, la cual es la longitud del promotor deseado (datos no mostrados).

4.2.4. Optimización del protocolo de PCR

Se procedió por tanto a buscar bibliografía que pudiese ser de ayuda para amplificar correctamente los promotores y se encontró un artículo donde habían tenido el mismo problema para clonar promotores ricos en adeninas y timinas. Se estudió entonces la composición de nuestros promotores diana y se confirmó que también eran ricos en A y T (en torno al 60-65%). En este estudio se solucionaba el problema de la amplificación añadiendo

mayor concentración de $MgCl_2$, ampliando la desnaturalización inicial del ciclo y uniendo en uno solo el paso del alineamiento con el de la extensión del ciclo. Constando así, cada ciclo únicamente de 2 pasos, y realizando la extensión final del programa a la temperatura del segundo paso del ciclo (Dhatterwal *et al.*, 2017).

ATAAAC TAAAAT AAAAG AAATAATT GG TTTT GT CTTT G TTTTTT AAAT GGATAAATAAGATAAGATTTTCTATATAAGTTGGAAAAAAAA

Figura 14. Ejemplo de secuencia de p19 de alrededor de 90 nucleótidos con alto porcentaje de Adenina y Timina.

Se probaron entonces, mezclas de reacción para los primers de p25 añadiendo 150 ng de ADN genómico y 2 concentraciones diferentes de $MgCl_2$, 1 mM y 3 mM. Además de combinarlas con 2 programas diferentes. El primero con una desnaturalización inicial de 3 min. a 98°C, y un ciclo formado por 2 pasos, una desnaturalización de 30 s. a 98°C y un segundo paso de 3 min. a 65°C, con un final de programa de 5 min. a 65°C. El segundo, era similar pero bajando la temperatura de 65°C a 60°C en ambos pasos.

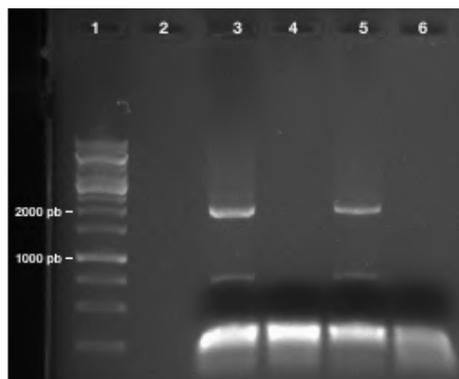


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calles 3 y 4 para los productos de las PCRs realizadas con el programa de 65°C, y calles 5 y 6 para los productos de las realizadas a 60°C. La concentración de $MgCl_2$ fue 3 mM para las calles 3 y 5, mientras que para las calles 4 y 6 fue 1 mM.

Como se observa en la Figura 15, las PCRs con las que se obtuvieron bandas y productos deseables fueron ambas en las que se usaron la mayor concentración de $MgCl_2$, siendo la banda más intensa para el programa con temperaturas de 65°C. Se puede deducir que el factor clave es la concentración de $MgCl_2$, ya que con una concentración baja no se produce la amplificación apropiada de estos promotores ricos en adenina y timina, mientras que la temperatura también influye pero en menor medida, variando la intensidad de la banda.

Se replicaron las condiciones más óptimas, mayor concentración de $MgCl_2$ y 65°C, para clonar p19 y p26. Después, para reamplificar p25, se probó como ADN 1 μL de la elución de

la banda purificada extraída del gel de agarosa, con una concentración 3 mM de MgCl₂. Se usó un programa de PCR estándar similar al descrito para la amplificación de *TGA9* de *Arabidopsis*.

La reamplificación de p25 no salió correctamente, ya que se esperaba una mayor cantidad e intensidad que para la amplificación previa. Se procedió por tanto a amplificar p25 con el programa que anteriormente había sido efectivo, además se hizo por duplicado para obtener la mayor cantidad posible después de purificar y reamplificar. Por otro lado, la amplificación de p26 fue bastante exitosa y aunque la de p19 no tanto, se procedió a realizar la reamplificación de ambas (Figura 16).

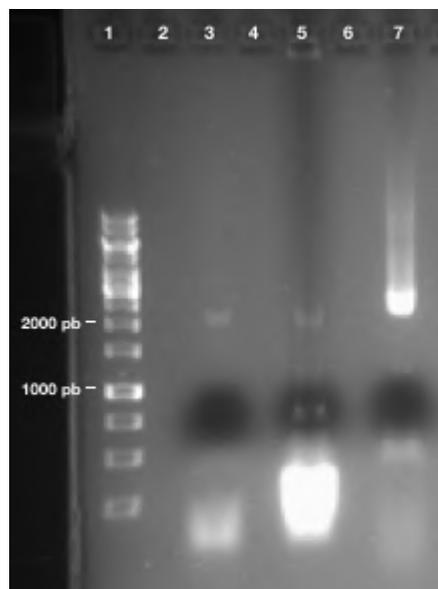


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calles 3 y 7 para la amplificación de p19 y p26 respectivamente. Calle 5 para el producto de la reamplificación de p25.

Las purificaciones correspondientes a las bandas obtenidas por electroforesis fueron poco eficientes y con una concentración del eluido bastante baja (todo los eluidos que se mencionan tienen un volumen de 30 µL). Para las bandas de p25 de la Figura 15, se obtuvieron eluidos de 2,3 y 1,8 ng/µL. Mientras que en la Figura 16, el eluido de la banda de p26 tuvo una concentración de 2,5 ng/µL y el de p19 de 1,4 ng/µL.

4.2.5. PCR de alta fidelidad con las condiciones óptimas

Como se ve en la Figura 17, la PCR doble de p25 dió como resultado una banda de gran intensidad. Sin embargo, en la reamplificación de p26 se obtuvo una banda muy tenue y para p19 no se observó banda a la altura correspondiente.

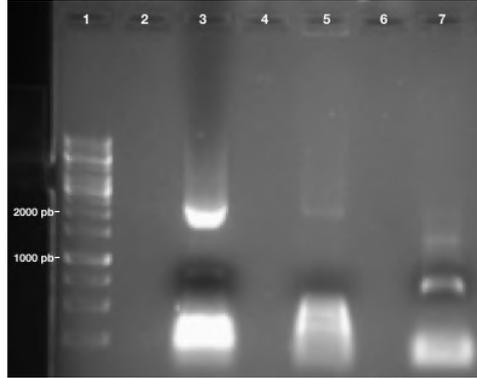


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1 para el patrón, calle 3 para la doble PCR de p25, calle 5 y 7 para la reamplificación de p26 y p19 respectivamente.

Las reamplificaciones no estaban teniendo el efecto deseado, ya que no se conseguía tener una cantidad adecuada para proceder a realizar las digestiones y ligaciones posteriores. Se encontró bibliografía sobre reamplificar cogiendo con una punta de pipeta un poco de ADN del gel de agarosa ya corrido, pudiendo ser una buena opción para tener mejores resultados. Se probó esta metodología picando del gel de p26 y usándolo como genómico para una PCR pero no se obtuvo ninguna banda (datos no mostrados).

Para las amplificaciones se optó por realizar dos PCRs independientes de p26 para obtener la mayor cantidad posible, mientras que para p19 se optó por aumentar la cantidad de ADN genómico usado ya que las PCRs anteriores no habían dado resultado. Por tanto, se probó a usar 300 ng de ADN genómico en vez de los 150 ng que se usaban para las demás. Esto sí funcionó adecuadamente. Tras esto, se hicieron las purificaciones correspondientes. Tanto para el eluido de las dos PCRs de p25, como para la PCR con mayor cantidad de ADN de p19, se obtuvieron mayores concentraciones siendo los resultados 6,3 y 4,1 ng/ μ L respectivamente. Sin embargo, la purificación de las dos PCRs de p26 dio una concentración baja, 1,5 ng/ μ L (datos no mostrados).

4.2.6. Digestión de insertos y plásmido

Una vez obtenido una pequeña cantidad de eluidos de las amplificaciones de promotores, aunque con concentraciones bastante bajas, se puso en marcha la fase de clonación para transferir el inserto al vector de interés. La clonación de estos en el vector se realizó a través de corte por enzimas de restricción y posterior ligación. Las digestiones se hicieron unificando los eluidos de los promotores p19, p25 y p26 obtenidos anteriormente, en un mezcla de digestión con las enzimas necesarias (Pst I y Xho I para p19 y p26, y Pst I y Apa I para p25). Los residuos producidos de la digestión se eliminaron purificando los productos empleando acetato sódico y lavando con etanol.

El vector objetivo, pGreen, se extrajo de un stock de bacterias ya transformadas y se procedió a linearizar y desfosforilar para evitar una ligación propia. Se digirieron 2 mezclas con diferentes enzimas para las diferentes complementariedades de las amplificaciones de promotores. Se comprobó que el plásmido estaba digerido comparando el producto de la digestión con el inicial por electroforesis (dato no mostrado). En este caso se utilizó todo el producto para correr la electroforesis. La banda del plásmido digerido se purificó y se extrajeron eluidos 8,8 y 6,9 ng/ μ L respectivamente. Al tener concentraciones tan bajas, se concentraron evaporando el disolvente en un Concentrator Plus (Eppendorf) hasta 5 μ L obteniendo concentraciones de aproximadamente 30-40 ng/ μ L.

4.2.7. Intentos de ligación y clonación

La mezcla de ligación constaba de 10 μ L del eluido de la purificación del inserto del promotor y 1 μ L (~35 ng) del pGreen correspondiente aparte de las demás sustancias necesarias. La cantidad de inserto no se sabía ya que no se cuantificó una vez se resuspendió el pellet en agua ya que se perdería una parte, y se necesitaba la mayor cantidad posible para que la ligación fuese efectiva. Sin embargo se podía intuir que era bastante menor que del vector, ya que la cantidad de cada uno de los eluidos que se empezó a digerir era bastante pequeña y se habría perdido parte a través del proceso. La ligación se dejó 1 h. a temperatura ambiente y seguido de una incubación a 4°C toda la noche.



El resultado de la ligación se transformó en *E. coli* y se sembró en placas de LB sólido. Desafortunadamente no crecieron clones bacterianos, excepto para la ligación de la construcción pGreen-p26. Para esta, se realizaron PCR de colonias para comprobar que el promotor se había insertado en el plásmido, y que a su vez se habían incorporado a la bacteria.

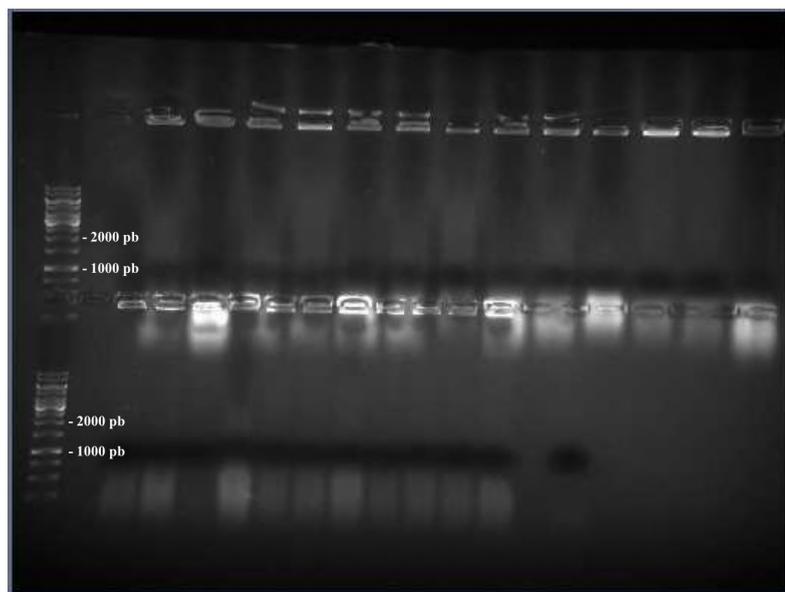


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa con 2 filas de pocillos. Primera calle de cada fila para el patrón molecular, las demás calles son PCRs de colonias de la placa pGreen-p26 (resto), en las que no se observa banda a la altura (2000 pb) del inserto deseado (promotor). Se deduce que el plásmido se ha incorporado vacío.

Al correr el gel, se pudo observar que las bacterias no contenían el inserto, habían incorporado plásmido sin digerir. Esto también pudo deberse a la escasa cantidad de inserto y por tanto a una pobre relación molar inserto/vector, cuando la óptima se encuentra entre 3-10/1.

Se procedió al segundo intento. Se amplificaron nuevamente los promotores obteniendo eluidos con concentraciones de 11,3, 7,2 y 6,6 ng/ μ L para p19, p25 y p26 respectivamente, en volúmenes de 30 μ L. El pGreen esta vez, se obtuvo lanzando un cultivo líquido con su posterior extracción del plásmido dando eluidos de 470 ng/ μ L.

Las digestiones de los insertos en este caso, al no tener que unificar eluidos se llevaron a un menor volumen final, 25 μ L. Por otro lado, para las digestiones del vector, se usó unos 10 μ g de este y volúmenes finales de 30 y 35 μ L. En este caso, la digestión se dejó toda la noche a 37°C en la estufa para tratar de linearizar todo el plásmido. Además, para la desfosforilación se añadió la enzima CIP con su tampón específico proveniente del mismo kit (CutSmart),

para asegurar que se desfosforilaba el extremo 5' de la cadena y que este no fuese el problema que ocasionase nuevamente el fallo en la ligación. En este caso para comprobar la correcta linearización del plásmido, solo se corrió en el gel una pequeña parte del producto, el resto se utilizó directamente, ya que al haber dejado la digestión toda la noche, se esperaba que hubiera muy poca cantidad de plásmido sin digerir.

La mezcla de ligación y la ligación se realizó de la misma manera que el intento anterior, con 10 μL del inserto purificado y 1 μL de plásmido pGreenR y pGreenB que esta vez estaban a concentraciones de 320 y 530 $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivamente. En esta ocasión se transformaron bacterias electrocompetentes con el producto de ligación. A los días, se comprobó que había colonias en 1 placa de cada fenómeno de ligación. Sin embargo, al hacer PCR de ellas se encontró que se había incorporado nuevamente el plásmido sin el inserto, es decir, que parte del plásmido se había quedado sin digerir, siendo el que transformó a las bacterias otorgándoles la resistencia para que crecieran.

Después de 2 intentos fallidos, se planteó posibles opciones donde podrían estar los problemas. Por un lado, las enzimas usadas no eran muy usuales por lo que podían dar problemas en algunos contextos que se desconocían, por ello, se cambiaron de los primers 1.0 a los primers 2.0 y 2.1. El otro problema es la poca cantidad de inserto que se obtenía de las amplificaciones y su posterior purificación. Para ello, se utilizaron 2 primers diferentes, los 2.0 para amplificar el promotor sin presencia de los sitios de restricción enzimáticos y los 2.1 para reamplificar añadiendo el resto necesario para la ligación. Así, esta reamplificación tendría que tener mayor eficiencia y obtener menos producto no deseado al usar oligos que se unen dentro de un inserto ya amplificado, técnica llamada PCR nested. Por otro lado, para eluir el producto de las purificaciones de las bandas de los geles, se añadieron 2 pasos más de elución con el tampón correspondiente con incubaciones a 70 $^{\circ}\text{C}$, con un total de 3 pasos para obtener 90 μL de eluidos a diferentes concentraciones, para perder el menor rendimiento posible en el proceso de la purificación.

Para el tercer intento, se realizó PCR para amplificar los promotores con los primers 2.0, y reamplificar estos posteriormente con los primers 2.1. Sin embargo, no funcionaban como se esperaba ya que se obtenían otras bandas de longitudes inferiores tanto en la amplificación como en la reamplificación (datos no mostrados). Tras probar con diferentes temperaturas de alineamiento, se obtuvieron eluidos pero con concentraciones pobres, parecidas al primer intento. Por su parte, los plásmidos se digirieron con las nuevas enzimas, dejándolos toda la



noche, después se corrieron en gel para purificar la banda, ya que los resultados anteriores mostraban que aún se quedaba plásmido sin digerir. Por otro lado, los insertos después de ser digeridos con las nuevas enzimas y se corrieron en un gel de electroforesis para purificar la banda (que era casi inexistente en algunos casos), obteniéndose eluidos que daban concentraciones cercanas al 0, dando lugar al fin del tercer intento y por correspondencia a los experimentos de clonación de promotores.



5. CONCLUSIONES

1. Las similitudes en la secuencia de aminoácidos entre FaTGA9 y AtTGA9, concretamente en la región de unión al ADN, indican que FaTGA9 también podría actuar como FT regulando la autofagia en fresa.
2. FaTGA9 se localiza en el núcleo al igual que su ortólogo AtTGA9 cuando se expresa en células de hoja de *N. benthamiana*, aunque su distribución intranuclear en este presenta diferencias.
3. La presencia de secuencias TGACG en los promotores de *FaATG8f* y *FaATG8g* indica que podrían ser dianas de FaTGA9 si actuase como FT.
4. La concentración de MgCl₂ es un factor clave en la amplificación de promotores de fresa ricos en A y T como ya se había demostrado en Arabidopsis.



6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dados los problemas encontrados en el proceso de clonación, lo siguiente sería probar otras estrategias para obtener finalmente los promotores en el vector seguido del gen de la luciferasa.

Una opción podría ser realizar la clonación de los promotores a través de la metodología Gateway como se hizo con *TGA9*, aunque para ello habría sido necesario el diseño de nuevos oligos. Un protocolo alternativo empleando los mismos oligos ya diseñados, sería el uso de pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), conveniente para productos de amplificación por PCR de ciertas polimerasas termoestables que suelen añadir una desoxiadenosina al extremo 3'. Este vector se encuentra prelinearizado con extremos de timina en el sitio de inserción para proporcionar un saliente compatible. Además de encontrarse el sitio de clonación múltiple en la región codificante de β -galactosidasa, que permite la identificación directa en las placas en presencia de X-gal, mediante la detección azul de los clones recombinantes a través de la inactivación por inserción.

Una vez encontrado un método eficiente para clonar los promotores, el siguiente paso dentro del proyecto sería obtener una construcción de cada promotor de *F. x ananassa* seguido por el gen de la luciferasa (*LUC*), y un promotor constitutivo como puede ser el 35S seguido del *FaTGA9*. Para estudiar a través de la detección de luz producida, la interacción entre la proteína y los promotores diana, y comprobar si realmente en fresa actúa como FT sobre *FaATG8*, al igual que lo hace su análogo en Arabidopsis. Para ello también se utilizaría como control positivo la interacción entre *AtTGA9* y *AtATG8B*. Todo ello transformando en *Agrobacterium* e infiltrando hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se ha empezado a estudiar la interacción con los promotores de *ATG8* porque en Arabidopsis demostraron que la interacción *TGA9-ATG8* era directa. Sin embargo, en un futuro se podría probar también con otros genes *ATG* que se hayan descrito que en Arabidopsis se induce su expresión cuando se sobreexpresa *AtTGA9*.

Para demostrar si *FaTGA9* induce o no la autofagia, podríamos comprobar si la sobreexpresión del FT en fresa activa esta en condiciones de inanición o bajo estrés osmótico. También se podría comprobar en ensayos con mutaciones en los promotores del gen *FaATG8* para ver si la activación de este proceso por la actuación de *FaTGA9* se reprime. Estas aproximaciones experimentales requerirían de la generación de plantas de fresa transgénicas.



7. BIBLIOGRAFÍA

Bao, Y., & Bassham, D. C. (2020). COST1 balances plant growth and stress tolerance via attenuation of autophagy. *Autophagy*, *16*(6), 1157–1158. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1752981>

Bao, Y., Pu, Y., Yu, X., Gregory, B. D., Srivastava, R., Howell, S. H., & Bassham, D. C. (2018). IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, *14*(9), 1562–1573. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1462426>

Boya, P. (2017) Autofagia: Como nuestras células se reciclan. *Revista SEBBM*. http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.01.2

Cao, J. J., Liu, C. X., Shao, S. J., & Zhou, J. (2021). Molecular Mechanisms of Autophagy Regulation in Plants and Their Applications in Agriculture. *Frontiers in plant science*, *11*, 618944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618944>

Chi, C., Li, X., Fang, P., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., Zhou, J., & Yu, J. (2020). Brassinosteroids act as a positive regulator of NBR1-dependent selective autophagy in response to chilling stress in tomato. *Journal of experimental botany*, *71*(3), 1092–1106. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz466>

Dhatterwal, P., Mehrotra, S., & Mehrotra, R. (2017). Optimization of PCR conditions for amplifying an AT-rich amino acid transporter promoter sequence with high number of tandem repeats from *Arabidopsis thaliana*. *BMC research notes*, *10*(1), 638. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2982-1>

Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. (s.f.). Obtenido de FAOSTAT agricultural data: <https://www.fao.org/faostat/es/#home>

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *28*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>



Huang, W. P., Scott, S. V., Kim, J., & Klionsky, D. J. (2000). The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *The Journal of biological chemistry*, 275(8), 5845–5851. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5845>

Huang, X., Zheng, C., Liu, F., Yang, C., Zheng, P., Lu, X., Tian, J., Chung, T., Otegui, M. S., Xiao, S., Gao, C., Vierstra, R. D., & Li, F. (2019). Genetic Analyses of the Arabidopsis ATG1 Kinase Complex Reveal Both Kinase-Dependent and Independent Autophagic Routes during Fixed-Carbon Starvation. *The Plant cell*, 31(12), 2973–2995. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00066>

Hummer, K. E., & Hancock, J. (2009). Strawberry Genomics: Botanical History, Cultivation, Traditional Breeding, and New Technologies. *Genetics and Genomics of Rosaceae*, Springer (New York, N. Y.) 413–435. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6_20

Hurley, J. H., & Young, L. N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual review of biochemistry*, 86, 225–244. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044820>

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of cell biology*, 147(2), 435–446. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.435>

Lee, Y. K., & Lee, J. A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB reports*, 49(8), 424–430. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.8.081>

Li, F., & Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in plant science*, 17(9), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.006>

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(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>

Liu, Z., Ma, H., Jung, S., Main, D., & Guo, L. (2020). Developmental Mechanisms of Fleshy Fruit Diversity in Rosaceae. *Annual review of plant biology*, 71, 547–573. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-111119-021700>



- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, *26*(4), 403–410. <https://doi.org/10.1038/82521>
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual review of plant biology*, *69*, 173–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606>
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R., & Avin-Wittenberg, T. (2016). Autophagy in Plants--What's New on the Menu?. *Trends in plant science*, *21*(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.008>
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, *130*(1), 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>
- Poling, E. B. (2012). Strawberry plant structure and growth habit. *New York State Berry Growers Association, Berry EXPO*.
- Rabinowitz, J. D., & White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6009), 1344–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>
- Rodriguez, M., Parola, R., Andreola, S., Pereyra, C., and Martinez-Noel, G. (2019). TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: do they always act according to the “yin-yang” model?. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, *280*, 110220. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110220>
- Sánchez-Sevilla, J. F., Botella, M. A., Valpuesta, V., & Sanchez-Vera, V. (2021). Autophagy Is Required for Strawberry Fruit Ripening. *Frontiers in plant science*, *12*, 688481. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.688481>
- Simpson, D. (2018). The economic importance of strawberry crops. *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives*. Springer International Publishing AG (Cham) 1-7. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9>
- Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z., & Galili, G. (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable



growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2839–2849. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri276>

Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Elsevier.

Tang, J., & Bassham, D. C. (2018). Autophagy in crop plants: what's new beyond *Arabidopsis*?. *Open biology*, 8(12), 180162. <https://doi.org/10.1098/rsob.180162>

Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., & Vierstra, R. D. (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant physiology*, 138(4), 2097–2110. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060673>

Wang, Y., Cai, S., Yin, L., Shi, K., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J., & Zhou, J. (2015). Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating ATG genes and inducing autophagy. *Autophagy*, 11(11), 2033–2047. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1098798>

Wang, Y., Cao, J. J., Wang, K. X., Xia, X. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., & Zhou, J. (2019). BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Autophagy and Nitrogen Starvation in Tomato. *Plant physiology*, 179(2), 671–685. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01028>

Wang, P., Nolan, T. M., Yin, Y., & Bassham, D. C. (2020). Identification of transcription factors that regulate *ATG8* expression and autophagy in *Arabidopsis*. *Autophagy*, 16(1), 123–139. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1598753>

Wen, X., & Klionsky, D. J. (2016). An overview of macroautophagy in yeast. *Journal of molecular biology*, 428(9 Pt A), 1681–1699. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.021>

Zhuang, X., Chung, K. P., Luo, M., & Jiang, L. (2018). Autophagosome Biogenesis and the Endoplasmic Reticulum: A Plant Perspective. *Trends in plant science*, 23(8), 677–692. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.002>



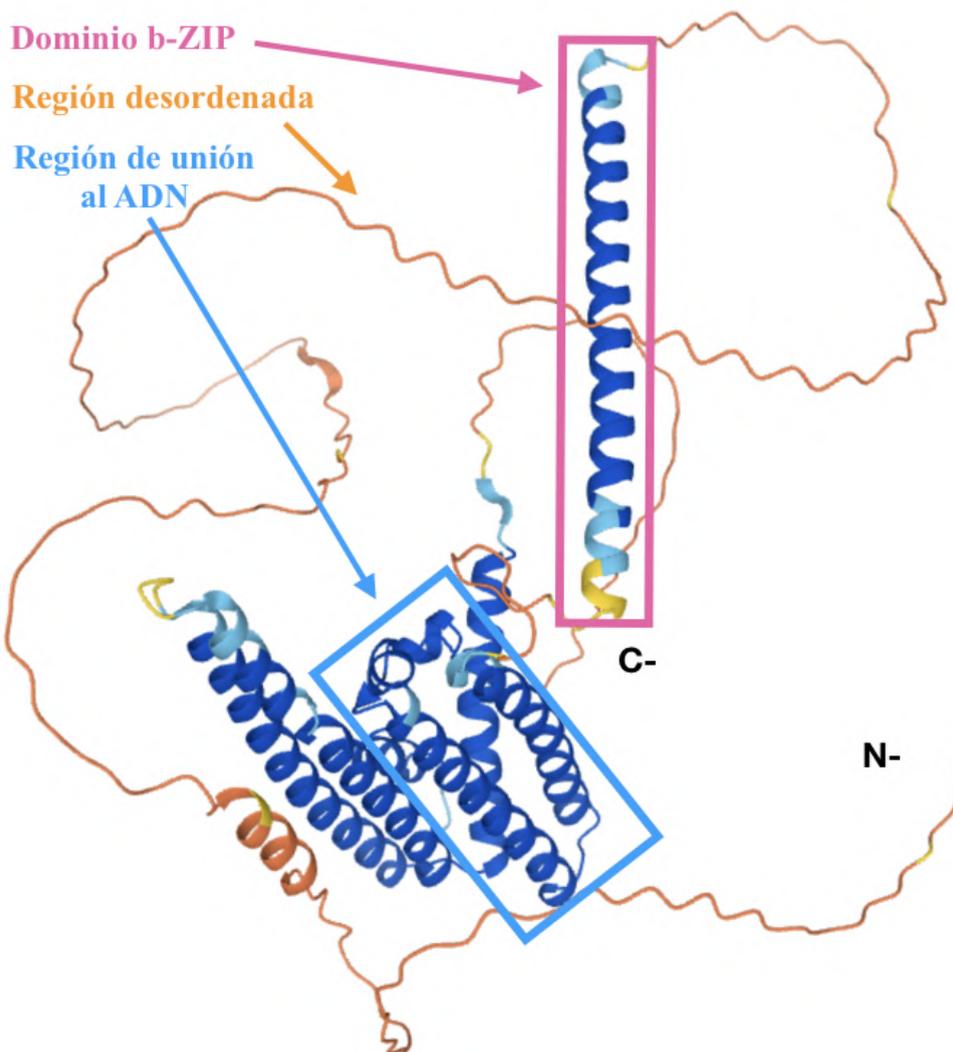
8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Alineamiento de TGA9 y predicción de estructura.

Resultados del alineamiento (Blast) de TGA9 de Arabidopsis con sus homeólogos de *Fragaria vesca* (FvTGA9) y *F. x ananassa* (FaTGA9.1, FaTGA9.2, FaTGA9.3 y FaTGA9.4). Zona en naranja asociada a la región desordenada, zona en rosa asociada al dominio b-ZIP y zona en azul asociada a la región de unión al ADN diana (siguiente página).

Predicción de la estructura de TGA9 de Arabidopsis a través del programa de Alphafold. Dominio b-ZIP enmarcado en rosa, región desordenada en color naranja y región de unión al ADN enmarcada en azul.

AtTGA9 (Predicción de Estructura por Alphafold)



AtTGA9	-----MANHRMSEATNHHNHHLPYSLI-H	24
FvTGA9_FvH4_3g24830	-----MAASHRVVGDGLSDSGPSSSNHHVYPATVLH	32
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	MAFISATCPDSSFFLEYKDENGLLRKSCMAASHRVVGDGLSDSGPSSSNHHVYPATVLH	60
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	MAFISATCDSSFFLEYKDENGLLRKSCMAASHRVVGDGLSDSDPSSSNHHVYPATVLH	60
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	MAFISATCPDSSFFLEYKDENGLLRKSCMAASHRVVGDGLSDSGPSSSNHHVYPATVLH	60
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	MAFISATCPDSSFFLEYKDENGLLRKSCMAASHRVVGDGLSDSGPSSSNHHVYPATVLH	60
	:.: :*: : * : *	
AtTGA9	GLNNHPSSGFINQDGSSSFDFGELEEAIVLQGVKYNREEAKPPLLGGGGATTLEMFP	84
FvTGA9_FvH4_3g24830	GI--NAPSTSFL-NQEGSTFDFGELEEAIAIQ---VRNEEAQAPLFTG-RPAATLEMFP	85
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	GI--NAPSTSFL-NQEGSTFDFGELEEAIAIQ---VRNEEAQAPLFTG-RPAATLEMFP	113
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	GI--NAPSTSFL-NQEGSTFDFGELEEAIAIQ---VRNDEAQAPLFTG-RPAATLEMFP	113
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	GI--NAPSTSFL-NQEGSTFDFGELEEAIAIQ---VRNDEAQAPLFTG-RPAATLEMFP	113
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	GI--NAPSTSFLRNQEGSTFDFGELEEAIAIQ---VRNDEAQAPLFTG-RPAATLEMFP	114
	*: * *: :.: :*: ***** * ***: ** : *	
AtTGA9	WPIRTHQTLPTSESSKSGESSDSGSANFS-----GKAESQQPESPMSSKHH-----	130
FvTGA9_FvH4_3g24830	WPMRYHQT PRGSSKSAGGESTDSGSQVNTTTLTSKGDQTOVEPESPI SKLASSSNHHHHQ	145
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	WPMRYHQT PRGSSKSAGGESTDSGSQVNTTTLTSKGDQTOVEPESPI SKLASSSNHHHHQ	173
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	WPMRYHQT PRGSSKSAGGESTDSGSQVNTTTLTSKGDQTOVEPESPI SKIASSSNHHHHQ	173
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	WPMRYHQT PRGSSKSAGGESTDSGSQVNTTTLTSKGDQTOVEPESPI SKIASSSNHHHHQ	173
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	WPMRYHQT PRGSSKSAGGESTDSGSQVNTTTLTSKGDQTOVEPESPI SKIASSSNHHHHQ	174
	:* ** .: .: *: ***** : * . : ***: *	
AtTGA9	-----LMLQPHN-----NMAN-----SSSTGLPSTSRTLAPPKPEDKRKA---T	169
FvTGA9_FvH4_3g24830	HQALDQNHLLQFQ---QQLQDDMAISDTTRATTVATGAAEASKGQSAPKPNHEKRRKAGST	202
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	HQALDQNHLLQFQ---QQLQDDMAISDTTRATTVATGAAEASKGQSAPKPNHEKRRKAGST	230
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	HQALDQNHLLQFQQQQQQLQDDMAISDTSRATTVATGAAEPSKGQSAPKPNHEKRRKAGST	233
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	HQALDQNHLLQFQQQQQQLQDDMAISDTSRATTVATGAAEPSKGQSAPKPNLEKRRKAGST	233
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	HQALDQNHLLQFQQQ-QQLQDDMAISDTSRATTVATGAAEPSKGQSAPKPNHEKRRKAGST	233
	* : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	TSGKQLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLSQLEQLQRARSQGLFMG	229
FvTGA9_FvH4_3g24830	SENRLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLTQLEQDLQRARAQGLLMG	262
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	SENRLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLTQLEQDLQRARAQGLLMG	290
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	SENKQLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLTQLEQDLQRARAQGLLMG	293
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	SENKQLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLTQLEQDLQRARAQGLLMG	293
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	SENKQLDAKTLRRLAQNREAAKRSRLRKKAYVQQLESSRIKLTQLEQDLQRARAQGLLMG	293
	:.: * ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	GCGPPGPNITSGAAIFDMEYGRWLEDNDRHMSEIRTLGLQAHLSNDNLRIVDGYIAHFDE	289
FvTGA9_FvH4_3g24830	GCGGFGNISSAAAI FDEMYARWLEDNDRHMSELRTGLQAHLSNDNLRIVDGYI SHYDE	322
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	GCGGFGNISSAAAI FDEMYARWLEDNDRHMSELRTGLQAHLSNDNLRIVDGYI SHYDE	350
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	GCGGFGNISSAAAI FDEMYARWLEDNDRHMSELRTGLQAHLSNDNLRIVDGYI SHYDE	353
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	GCGGFGNISSAAAI FDEMYARWLEDNDRHMSELRTGLQAHLSNDNLRIVDGYI SHYDE	353
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	GCGGFGNISSAAAI FDEMYVWLEDNDRHMSELRTGLQAHLSNDNLRIVDGYI SHYDE	353
	** * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	IFRLKAVAAKADVFHLI IGTWMSPAERCFLWAGFRPSDLIKILVSDMDLLTEQQVMGIY	349
FvTGA9_FvH4_3g24830	IFQLKGVAAKSDVFHLITGLWASQAERCFLWGGFRPSDLIKMLTQQLDPITEQQVMGIC	382
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	IFQLKGVAAKSDVFHLITGLWASQAERCFLWGGFRPSDLIKMLTQQLDPITEQQVMGIC	410
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	IFQLKGVAAKSDVFHLITGMWASQAERCFLWGGFRPSDLIKMLTQQLDPITEQQVMGIC	413
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	IFQLKGVAAKSDVFHLITGMWASQAERCFLWGGFRPSDLIKMLIQQLDPITEQQVMGIC	413
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	IFQLKGVAAKSDVFHLITGMWASQAERCFLWGGFRPSDLIKMLTQQLDPITEQQVMGIC	413
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	SLQHSQQAEALTSQGLEQLQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKISNLEGFVRQADNL	409
FvTGA9_FvH4_3g24830	SLQHSQQAEALTSQGLDQLHQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKLTNLDGFVRQADNL	442
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	SLQHSQQAEALTSQGLDQLHQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKLTNLDGFVRQADNL	470
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	SLQHSQQAEALTSQGLDQLHQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKLTNLDGFVRQADNL	473
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	SLQHSQQAEALTSQGLDQLHQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKLTNLDGFVRQADNL	473
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	SLQHSQQAEALTSQGLDQLHQSLIDTILASFPVLDGMQMAVALGKLTNLDGFVRQADNL	473
	***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	469
FvTGA9_FvH4_3g24830	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	502
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	530
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	533
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	533
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	RQQTTLHQLRRLITVRQAARCFVLIGEYYGRLRALSSLWASRPRESMMSDDNSCQTTDLQ	533
	***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
AtTGA9	IVQ-SSRNHFSNF 481	
FvTGA9_FvH4_3g24830	MVHQPSQNHFSS 515	
FaTGA9.1_FxaC_9g27060	MVHQPSQNHFSS 543	
FaTGA9.2_FxaC_10g28070	MVHQPSQNHFSS 546	
FaTGA9.3_FxaC_11g24800	MVHQPSQNHFSS 546	
FaTGA9.4_FxaC_12g22330	MVHQPSQNHFSS 546	
	:* : * : * : * : *	

Región desordenada
Dominio b-ZIP
Región de unión al ADN

