



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Doctorado en Ciencias Forestales

**Jasmonatos en frutilla (*Fragaria × ananassa*):
caracterización fisiológica y molecular de los
componentes de la vía de biosíntesis y señalización,
y análisis estructura-función de los represores JAZ**



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales

Adrián Garrido Bigotes

CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Carlos Rodrigo Figueroa Lamas
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Jasmonatos en frutilla (*Fragaria x ananassa*): caracterización fisiológica y molecular de los componentes de la vía de biosíntesis y señalización, y análisis estructura-función de los represores JAZ

Comisión Evaluadora:

Carlos Rodrigo Figueroa Lamas (Profesor guía)

Ingeniero Agrónomo, Dr.

Marcela Eliana Torrejón Quezada (Profesor co-guía)

Bioquímico, Dra.

Rodrigo Jorge Hasbún Zaror (Comisión evaluación)

Ingeniero Forestal, Dr.

Gerardo Tapia San Martín (Comisión evaluación)

Bioquímico, Dr.

Director de Postgrado:

Regis Teixeira Mendonça

Ingeniero Químico, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino Cancino

Ingeniero Forestal, Dr.



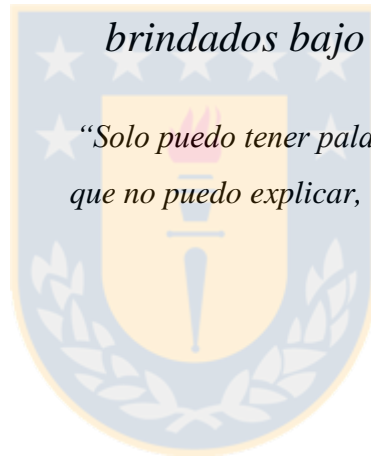
DEDICATORIA

A mi madre, por su amor, fuerza y apoyo incondicional

brindados bajo todas las circunstancias,

*“Solo puedo tener palabras de gratitud y un sentimiento
que no puedo explicar, en la cercanía y en la distancia.”*

Adrián Garrido



A mi padre, por su recuerdo imborrable,

*“Este trabajo comenzó con tu partida, y hoy,
es el resultado y satisfacción dibujados en tu sonrisa.”*

Adrián Garrido

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres Tere y Martín, por sus palabras el día que quise venirme a Chile: “si es lo que quieres y te va a ayudar, adelante”. Este es comienzo del camino, agradecer valores y responsabilidad inculcados. A mis hermanos: María, Juan, Martín, Pili, Maresa, Chete y Susana, y a mis sobrinos: Zara, David, Ivan, Daniel, María, Julia, Tomás, Amanda, Sergio, Natalia, Sheila y Guillermo, me llena de gozo tenerlos a todos cada vez que regreso. A todos os extraño como si estuviera al otro lado del mundo (ja, ja, ja). A ti Angelo, por darme tanto en tan poco tiempo, palabras de apoyo, sentimientos y que el futuro sea nuestro, gracias por todo. A mi gran, valiosa y extensa familia chilena, en especial a la familia Garrido Jarpa, gracias absolutamente por su cobijo y buenos ratos.

Agradezco a mi profesor guía, Carlos Figueroa, por sus directrices, enseñanzas y apoyo durante el inicio, desarrollo y fin de esta tesis doctoral. Sus consejos, profesionalidad, valores y favores han sido, sin duda, claves para el término exitoso de la misma, ya que a pesar de estar en ciudades diferentes durante largo tiempo, nunca sentí el abandono. Igualmente agradecer a mi profesora co-guía Marcela Torrejón, por su disposición inmediata, confianza, capacidad crítica y apoyo, personal y profesional, puedo decir que me siento LSD (ja, ja, ja). Al profesor Pablo Figueroa por sus aportes y colaboración en el desarrollo de esta tesis y trabajos conjuntos. Agradecer también, a Rodrigo Hasbún y Gerardo Tapia como miembros de la comisión evaluadora por su visión científica del trabajo para su mejora. Sin duda, ha sido sumamente valioso este elenco de investigadores para el desarrollo de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Forestales y sus trabajadores, en especial a Darcy Ríos, Manuel Sánchez, Margarita Figueroa, y al actual director del programa Regis Teixeira. Gracias por su apoyo en momentos difíciles, algo que no olvidaré. A los miembros del ya extinto y reemplazado “Team Frutilla”: Nico, Gabi, Gabriela, Camilo, Leticia,... También agradecer a Daniela Fernández y a Paz Zúñiga como miembros del proyecto en el cual se enmarcó esta investigación, grandes personas y excelentes profesionales.

No puedo olvidar agradecer al Laboratorio de Señalización y Desarrollo (LSD) de la Facultad de Ciencias Biológicas: Soraya, Andrea, Ignacio, Checho, Carlos, Jano, Gaby, Gabriel, Maria José y Renato, así como a miembros de otros laboratorios, personal auxiliar y a la secretaria Vero. Aunque el periodo de adaptación difícil, con el tiempo me lo hicieron más fácil, gracias de corazón.

También quiero agradecer al laboratorio 317 del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), en especial a Roberto Solano por abrirme las puertas de ese gran equipo humano y profesional, y hacerme sentir como un miembro más durante mi pasantía doctoral. Debo mencionar igualmente a Andrea, Alberto, Gemma, Selena, Isa, María, Jose, Andrés, Gloria y Sophie, para los que únicamente tengo palabras de gratitud. A Michelle, compañera de piso durante mi estancia en Madrid, igualmente gracias.

Agradezco a mis amigos y compañeros de la facultad Jocelyn, Samuel, Paula, Cynthia, Pamela, Margarete, entre otros muchos, por esos ratos vividos, inolvidables y espero que pronto, retomables, mil gracias! A ti bicho, por tu amistad, que aunque no exista mucho tiempo para vernos, se aprovecha al máximo cuando nos juntamos, y fuiste un gran apoyo cuando más lo necesité. A Tia Ardilla , y su familia, por su amistad, y por ayudarme en un momento donde mi vida se derrumbó.

A mis amigos de Chile, María, Gris, Cristian, Giannina, Paula, Clara, Pedro y otros muchos, solo espero que esta amistad dure siempre y se afiance aún más, acá en Chile, en España o en cualquier parte del mundo.

A mis amigos de España, Diego, Camino, Verónica, Ale, Laura, Adrián, el otro Adrián, Silvia, y podría continuar... en mi cojín aparecéis la mayoría, así que no os olvido. A Maria Jesús y al recuerdo de alguien que hace poco nos dejó. Gracias eternas a todos.

También una mención especial merecen los profesionales y compañeros del curso de Genética Molecular de Levaduras realizado en Buenos Aires, en especial a Simón, Claudia y Daniela, gracias por todo compañeros.

Gracias a la Universidad de Concepción por ser mi *alma mater*, en especial a la Facultad de Ciencias forestales, a CONICYT por su financiamiento para el desarrollo de esta tesis doctoral (Folio beca: 21151411), y a FONDECYT (Proyecto regular 1140663) por el financiamiento para el desarrollo de la investigación.

Y finalmente, no puedo olvidarme de como comenzó toda esta aventura en Chile. A Pablo y Graciela, a los que aún recuerdo con inmenso cariño. Espero verlos pronto.

Quizás sean agradecimientos muy extensos, pero quizás no sepan lo que significa tener todo el apoyo arriba mencionado, al menos no saben lo que para mi significa.

“Estamos rodeados de excelencia, abran los ojos, observen y sientan la gratitud.”

Adrián Garrido

 **CHILE**, allá donde esté...ETERNAMENTE AGRADECIDO

ABREVIATURAS

13-LOX	(13-Lipoxygenase) 13-Lipoxigenasa
50%R	(50% red receptacle) Estadio 50% maduro
α -LA	(α -linolenic acid) Ácido α -linolénico
ABA	(Abscisic acid) Ácido abscísico
AD	(Activation domain) Dominio de activación
ADE2	Gen de adenina 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANR	(Anthocyanidin reductase) Antocianidina reductasa
ANS	(Anthocyanidin synthase) Antocianidina sintasa
AOC	(Allene oxide cyclase) Aleno oxido ciclasa
AOS	(Allene oxide synthase) Aleno oxido sintasa
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Acidez titulable
AUXs	(Auxins) Auxinas
B	Estadio blanco
bHLH	(Basic helix-loop-helix) Dominio de unión al ADN bHLH
BRs	(Brassinosteroids) Brasinoesteroides
cDNA	(Complementary DNA) ADN complementario
CDS	(Coding sequence) Secuencia codificante
CKs	(Cytokinins) Citoquininas
CMID	(Cryptic MYC2-Interacting Domain)
COI1	(CORONATINE INSENSITIVE 1)
COR	(Coronatine) Coronatina
CSS	Contenido de sólidos solubles
CT	(Carboxy terminal domain) Dominio carboxilo terminal
DAA	(Days after anthesis) Días post-antesis
DBD	(DNA binding domain) Dominio de unión al ADN
DNA	(Deoxyribonucleic acid) Ácido desoxirribonucleico
DO	(Dropout)
EAR	(Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression)
EGL3	(ENHANCER OF GLABRA 3)

ET	(Ethylene) Etileno
F	(Flower) Flor
FT	Factor de transcripción
GAPDH	(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GAL4	Factor de transcripción GAL4
GAs	(Gibberelins) Giberelinas
GW	(Gateway system) Sistema de clonación Gateway
HDA	(Histone deacetylases) Histonas deacetilasa
<i>HIS3</i>	Gen de histidina 3
JA	(Jasmonic acid) Ácido jasmónico
JA-Ile	(Jasmonoyl isoleucine) Jasmonato isoleucina
JAM1	(JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like)
JAR1	(Jasmonic acid amide synthase 1) Ácido jasmónico amido sintetasa 1
JAs	(Jasmonates) Jasmonatos
JAZ	(JASMONATE ZIM-DOMAIN) Proteínas represoras JAZ
JID	(JAZ INTERACTION DOMAIN)
JIH1	(Jasmonoyl isoleucin hydrolase 1) Jasmonato isoleucina hidrolasa 1
JMT	(Jasmonic acid methyl transferase) Ácido jasmónico metiltransferasa
<i>LacZ</i>	Gen de β -galactosidasa
<i>Leu</i>	Mutante para el gen de leucina
LAR	(Leucoanthocyanidin reductase) Leucoantocinidina reductasa
LG	(Large green) Estadio verde grande
MBW	(MYB-bHLH-WD40 complex) Complejo MBW
MeJA	(Methyl jasmonate) Metil jasmonato
MJE	(Methyl jasmonate esterase) Metil jasmonato esterasa
NCED	(9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase) 9-cis epoxy-carotenoide dioxigenasa
NINJA	(Novel Interactor of JAZ)
NLS	(Nuclear Signal Localization) Señal de localización nuclear

OD ₆₀₀	(Optical density 600 nm) Densidad óptica a 600 nm
OPDA	(12-oxophytodienoic acid) Ácido 12-oxo-fitodienoico
OPR3	(13-oxo-phytedoenoic reductase 3) 12-oxo-fitodienoico reductasa 3
PAL	(Phenylalanine ammonia lyase) Fenilalanina amonio liasa
PAP1	PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1
PAs	(Proanthocyanidins) Proantocianidinas
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa
R	(100% red receptacle) Estadio 100% maduro
RNA	(Ribonucleic acid) Ácido ribonucleico
RT-PCR	(Reverse transcription-PCR) Transcripción reversa-PCR
RT-qPCR	(Reverse transcription-quantitative real-time PCR) Transcripción reversa PCR cuantitativa en tiempo real
SA	(Salicylic acid) Ácido salicílico
SCF	(Skp-Cullin-F-box-type E3)
SD	(Synthetic defined medium) Medio sintético definido
SG	(Small green) Estadio verde pequeño
SSC	(Soluble Solid Content) Contenido sólidos solubles
T	(Turning) Estadio de transición
TA	(Titratable acidity) Acidez titulable
TAC	(Total anthocyanin content) Contenido total de antocianinas
TAD	(Transactivation domain) Dominio de activación
TFs	(Transcription Factors) Factores de transcripción
TPL	(TOPLESS)
<i>Trp</i>	Mutante para el gen de triptófano
TT2	(TRANSPARENT TESTA 2)
TT8	(TRANSPARENT TESTA 8)
TTG1	(TRANSPARENT TESTA GLABRA 1)
UFGT	(Uridine diphosphate-glucose:flavonoid 3-O-glycosyltransferase) Uridina difosfato-glucose:flavonoide 3-o-glucosiltransferasa
W	(White) Estadio blanco
Y2H	(Yeast-Two Hybrid) Doble híbrido de levadura

Tabla de contenido

Índice de tablas.....	xii
Índice de figuras.....	xv
Resumen.....	xix
Abstract.....	xxi
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1. La frutilla: generalidades e importancia comercial.....	1
1.2. Desarrollo y maduración de frutos de frutilla.....	2
1.3. Cambios físico-químicos de los frutos durante el desarrollo y la maduración.....	2
1.4. Biosíntesis de flavonoides: biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas en frutilla.....	4
1.5. Regulación hormonal del desarrollo y la maduración de frutos: una visión fisiológica.....	8
1.6. Jasmonatos: efectos fisiológicos, metabolismo y vía de señalización.....	12
1.7. Las proteínas JAZ como reguladores de la vía de señalización de JAs y la biosíntesis de PAs y antocianinas.....	19
1.8. Referencias bibliográficas.....	21
Hipótesis.....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos.....	35
Capítulo 2: Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening.....	36
2.1. Abstract.....	36
2.2. Introduction.....	37
2.3. Material and methods.....	39
2.4. Results.....	43
2.5. Discussion.....	50
2.6. Conclusions.....	55
2.7. Acknowledgements.....	57
2.8. References.....	57
2.9. Supplementary Material.....	62

Capítulo 3: Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening.....	69
3.1. Abstract.....	69
3.2. Introduction.....	70
3.3. Materials and methods.....	72
3.4. Results.....	75
3.5. Discussion.....	90
3.6. Conclusions.....	96
3.7. Acknowledgements.....	96
3.8. References.....	97
3.9. Supplementary material.....	106
Capítulo 4: Una nueva secuencia de gen de la proteína JAZ1 de <i>Fragaria × ananassa</i> permite la interacción COI1-JAZ1 mediada por coronatina.....	133
4.1. Resumen.....	133
4.2. Introducción.....	134
4.3. Material y Métodos.....	135
4.4. Resultados.....	140
4.5. Discusión.....	148
4.6. Conclusiones.....	151
4.7. Agradecimientos.....	151
4.8. Referencias.....	151
4.9. Material suplementario.....	156
Capítulo 5: Los represores JAZ de <i>Fragaria × ananassa</i> participarían en la regulación la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína.....	166
5.1. Resumen.....	166
5.2. Introducción.....	167
5.3. Material y Métodos.....	169
5.4. Resultados.....	173
5.5. Discusión.....	186
5.6. Conclusiones.....	191
5.7. Agradecimientos.....	191
5.8. Referencias.....	191

5.9. Material suplementario.....	198
Capítulo 6: Discusión general.....	214
Conclusiones generales.....	222
Referencias generales.....	223
ANEXO A: Publicaciones.....	228
ANEXO B: Participaciones en congresos y simposios.....	229



Índice de tablas

Capítulo 2: Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening.

Table 2.1. Changes in firmness (N), color and total anthocyanin content (TAC) after MeJA treatment in strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i> cv. Aromas) fruits.	47
Table S2.1. Changes in weight (g), firmness (N), SSC/TA ratio and color at different developmental stages of strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i> cv. Aromas) fruit.	65
Table S2.2. Parameters of multiple reaction monitoring (MRM) transitions for quantification of phytohormones via electrospray ionization.	66
Table S2.3. Predicted mRNA sequences of <i>Fragaria vesca</i> for <i>Arabidopsis thaliana</i> JAR1, and <i>Nicotiana attenuata</i> JIH1 and MJE.	67
Table S2.4. Primers sequences used for RT-qPCR analysis performed in this work.	68

Capítulo 3: Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening.

Table 3.1. Genomic data of JAZ and MYC gene families in woodland strawberry (<i>Fragaria vesca</i>) and <i>Arabidopsis</i> , and their corresponding CDS and protein lengths.	76
Table S3.1. Predicted mRNA sequences of <i>Fragaria vesca</i> using JA signalling-related protein sequences of <i>Arabidopsis</i> as queries and Refseq-rna database of <i>F. vesca</i> as subject.	114
Table S3.2. Genomic information of JAZ and MYC genes of <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Fragaria vesca</i> , <i>Malus × domestica</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vitis vinifera</i> and <i>Oryza sativa</i> used for synteny analysis.	117
Table S3.3. Primers sequences used for RT-qPCR analysis of the genes analyzed in this research.	121
Table S3.4. Basic information of JAZ/TIFY and MYC proteins of <i>Arabidopsis</i> and <i>Fragaria vesca</i>	122
Table S3.5. Identity between <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Fragaria vesca</i> JAZ proteins obtained by multiple alignment.	124
Table S3.6. Identity between MYCs transcription factors sequences of <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Fragaria vesca</i> obtained by multiple alignment.	125

Table S3.7. Relative expression of JA signalling genes during development and ripening of <i>F. × ananassa</i> cv. Aromas fruits.	126
Table S3.8. LOG(10) transformed values used for heatmaps construction of JA-signalling genes during development and ripening of <i>F. × ananassa</i> cv. Aromas fruits.....	127
Table S3.9. Relative expression of <i>FaMYC2</i> , <i>FaJAZ1</i> and <i>FaJAZ8.1</i> after 100 μ M MeJA treatment.....	129
Table S3.10. Original FPKM values of JA-signalling genes in <i>F. × ananassa</i> cv. Camarosa obtained from RNAseq experiments	130
Table S3.11. LOG(10) transformed values from original FPKM values of JA-signalling genes obtained in <i>F. × ananassa</i> cv. Camarosa from RNAseq experiments.....	132

Capítulo 4: Una nueva secuencia de degron de la proteína JAZ1 de *Fragaria × ananassa* permite la interacción COI1-JAZ1 mediada por coronatina.

Tabla S4.1. Secuencias de primers usados para el aislamiento de las secuencias codificantes de COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 de <i>Fragaria × ananassa</i>	161
Tabla S4.2. Condiciones de las reacciones de recombinación con las clonasas BP y LR.	162
Tabla S4.3. Números de accesoión de secuencias de COI1 y JAZ de varias especies.....	163
Tabla S4.4. Números de accesoión de secuencias de las bases de datos ‘OneKP’ y ‘GDR’ usadas en los análisis de las secuencias ‘degron’.....	164
Tabla S4.5. Identidad de las secuencias de proteínas FaCOI1, FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 con sus ortólogos de otras especies.	165

Capítulo 5: Los represores JAZ de *Fragaria × ananassa* regulan la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína.

Tabla S5.1. Secuencias de primers usados para el aislamiento de las secuencias codificantes de NINJA, MYC2, JAM1, JAZ9, bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 de <i>Fragaria × ananassa</i>	205
Tabla S5.2. Números de accesoión de secuencias de aminoácidos de NINJA, MYC2/2-like, JAM1/2, JAZ9, bHLH3, bHLH33 y MYB10 de <i>F. vesca</i> y sus ortólogos en varias especies, en GenBank (NCBI) y otras bases de datos.	207
Tabla S5.3. Identidad de las secuencias de proteínas FaNINJA y sus ortólogos de otras especies.....	209

Tabla S5.4. Identidad de las secuencias de proteínas FaMYC2 y FaMYC2-like con sus ortólogos de otras especies	210
Tabla S5.5. Identidad de las secuencias de proteínas FaJAM1/bHLH013 y FaJAM2/bHLH003 con sus ortólogos de otras especies.	211
Tabla S5.6. Identidad de las secuencias de JAZ9 <i>F. × ananassa</i> con sus ortólogos de otras especies.	212
Tabla S5.7. Identidad de las secuencias de proteínas FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 con sus ortólogos de otras especies.	213



Índice de figuras

Capítulo 1: Introducción general.

Fig. 1.1. Biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas.....	6
Fig. 1.2. Cambios en el contenido de fitohormonas durante el desarrollo y maduración de <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	11
Fig. 1.3. Estructura y biosíntesis de jasmonatos.....	13
Fig. 1.4. Vía de señalización de jasmonatos.....	15
Fig. 1.5. Dominios estructurales y funcionales de las proteínas de la vía de señalización de los jasmonatos.	18
Fig. 1.6. Interacciones proteína-proteína de los represores JAZ con los componentes de la vía de señalización de JAs y factores de transcripción del complejo MBW de la biosíntesis de PAs y antocianinas en <i>Arabidopsis</i> y <i>Malus</i> × <i>domestica</i>	20

Capítulo 2: Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening.

Fig. 2.1. Oxylin metabolism pathway	38
Fig. 2.2. Jasmonic acid (JA), jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), methyl jasmonate (MeJA), oxophytodienoic acid (OPDA), and abscisic acid (ABA) levels from flowering to ripening of strawberry.....	44
Fig. 2.3. Changes in expression of JA-Ile biosynthesis-related genes and JA turnover-related genes from flowering to ripening of strawberry.....	46
Fig. 2.4. JA, JA-Ile, MeJA, OPDA levels and expression of JAs metabolism-related genes in strawberry fruit after MeJA treatment.....	49
Fig. 2.5. ABA levels and expression of <i>FaNCED1</i> in strawberry fruit after MeJA treatment.	50
Fig. 2.6. Antagonistic relationship from JA to ABA pathway during MeJA-induced anthocyanin accumulation in strawberry fruit.....	56
Fig. S2.1. Developmental stages of strawberry (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> cv. Aromas) used in the present research.	62
Fig. S2.2. Salicylic acid (SA) levels from flowering to ripening of strawberry.....	63
Fig. S2.3. Changes in expression of early JAs and MeJA biosynthesis-related genes from flowering to ripening of strawberry.....	64

Capítulo 3: Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening.

Fig. 3.1. Genome distribution and synteny of JAZ and MYC genes in <i>Fragaria vesca</i> and <i>Arabidopsis</i> chromosomes.....	77
Fig. 3.2. Exon-intron structures of the <i>Fragaria vesca</i> and <i>Arabidopsis</i> JAZ and MYC genes.	78
Fig. 3.3. Distribution of JAZ and MYC protein domains and motifs in <i>Fragaria vesca</i> and <i>Arabidopsis</i>	80
Fig. 3.4. Multiple alignment of JAZ and MYC protein domains in <i>Fragaria vesca</i> and <i>Arabidopsis</i>	81
Fig. 3.5. Logo sequences for FvJAZ and FvMYC proteins.	82
Fig. 3.6. Phylogenetic analysis of <i>Fragaria vesca</i> JAZ and MYC proteins.	84
Fig. 3.7. Expression heatmaps of <i>Fragaria × ananassa</i> JA signalling-related genes during fruit development and ripening.....	86
Fig. 3.8. Expression of <i>FaJAZ1</i> , <i>FaJAZ8.1</i> and <i>FaMYC2</i> under MeJA treatment in <i>Fragaria × ananassa</i> fruit.....	88
Fig. S3.1. Synteny analysis between <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Malus × domestica</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vitis vinifera</i> and <i>Oryza sativa</i> JAZ and MYC genes.....	106
Fig. S3.2. EAR motifs in <i>Fragaria vesca</i> (Fv) y <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) JAZ proteins.	107
Fig. S3.3. Multiple sequences alignment of degenerate Jas domain in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) and <i>Fragaria vesca</i> (Fv) JAZ7 and JAZ8 proteins.....	108
Fig. S3.4. Proanthocyanidins (PAs) and anthocyanins contents during development and ripening of <i>Fragaria × ananassa</i> (cv. Aromas) fruit.	109
Fig. S3.5. Molecular characterization of PEAPOD (PPDs) protein subfamily in <i>Fragaria vesca</i> and <i>Fragaria × ananassa</i>	110
Fig. S3.6. Expression patterns of JA signalling-related genes in achene and receptacle during development and ripening of <i>Fragaria × ananassa</i> (cv. Camarosa) fruit from FPKM values obtained from RNAseq experiments	112

Capítulo 4: Una nueva secuencia de degron de la proteína JAZ1 de *Fragaria × ananassa* permite la interacción COI1-JAZ1 mediada por coronatina.

Fig. 4.1. Comparación de co-receptor COI1 de <i>Fragaria × ananassa</i> y sus ortólogos. ...	143
--	-----

Fig. 4.2. Comparación de JAZ1, JAZ8, JAZ10 de <i>Fragaria × ananassa</i> con sus ortólogos.	145
Fig. 4.3. Comparación de las secuencias de gón de proteínas JAZ en la familia Rosaceae.	146
Fig. 4.4. Ensayos de doble híbrido de levadura entre las proteínas JAZs y COI1s en <i>F. × ananassa</i> y <i>A. thaliana</i>	147
Fig. S4.1. Mapa de vector dador ‘Gateway’ pDONR207 (A) y constructo pDONR207-FaCOI1 (B).	156
Fig. S4.2. Mapa de vectores destino pGADT7-GW (A) pGBKT7-GW (B) y constructos pGADT7-FaJAZ1 (C) y pGBKT7-FaCOI1 (D).	157
Fig. S4.3. Clonamiento de la región codificante de <i>FaCOI1</i> , <i>FaJAZ1</i> , <i>FaJAZ8.1</i> y <i>FaJAZ10</i> con extremos attB1 y attB2 mediante gel de agarosa.	158
Fig. S4.4. Identificación de clones recombinantes para <i>FaCOI1</i> , <i>FaJAZ1</i> , <i>FaJAZ8.1</i> y <i>FaJAZ10</i> recombinadas en el vector dador pDONR207.	159
Fig. S4.5. Identificación de clones recombinantes para <i>FaCOI1</i> , <i>FaJAZ1</i> , <i>FaJAZ8.1</i> y <i>FaJAZ10</i> recombinadas los vectores destino pGADT7-GW y pGBKT7-GW.	160
 Capítulo 5: Los represores JAZ de <i>Fragaria × ananassa</i> regulan la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína.	
Fig. 5.1. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de la proteína adaptadora NINJA de <i>Fragaria × ananassa</i> y sus ortólogos.	175
Fig. 5.2. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de la proteína adaptadora MYC2 de <i>Fragaria × ananassa</i> y sus ortólogos.	178
Fig. 5.3. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de las proteínas JAMs de <i>Fragaria × ananassa</i> y sus ortólogos.	180
Fig. 5.4. Comparación de JAZ9 de <i>Fragaria × ananassa</i> con sus ortólogos.	181
Fig. 5.5. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de los factores de transcripción bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 de <i>Fragaria × ananassa</i> y sus ortólogos.	183
Fig. 5.6. Interacciones de las proteínas JAZs con componentes de la vía de señalización de los JAs en <i>F. × ananassa</i>	184
Fig. 5.7. Interacciones de las proteínas JAZs con factores de transcripción del complejo MBW en <i>F. × ananassa</i>	186

Fig. S5.1. Mapas de las construcciones en el vector dador pDON207-GW y los vectores destino pGADT7-GW y pGBKT7-GW.....	198
Fig. S5.2. Análisis de tamaño de la region codificante de <i>FaNINJA</i> (A), <i>FaMYC2</i> (B) <i>FaJAM1</i> (C), <i>FaJAZ9</i> (D), <i>FabHLH3-2</i> , <i>FabHLH33-2</i> (E) y <i>FaMYB10-2</i> (F) con extremos attB1 y attB2 mediante gel de agarosa.....	200
Fig. S5.3. Análisis de tamaño de la region codificante de <i>FaMYC2</i> , <i>FabHLH3-2</i> , <i>FabHLH33-2</i> , <i>FaJAM1</i> , <i>FaMYB10-2</i> (A), <i>FaNINJA</i> (B) y <i>FaJAZ9</i> (C) con secuencias attB1 y attB2 purificadas mediante extracción a partir de gel de agarosa.....	201
Fig. S5.4. Identificación de clones recombinantes para <i>FaNINJA</i> , <i>FaMYC2</i> , <i>FaJAM1</i> , <i>FaJAZ9</i> , <i>FabHLH3-2</i> , <i>FabHLH33-2</i> y <i>FaMYB10-2</i> en el vector dador pDONR207... 202	202
Fig. S5.5. Identificación de clones recombinantes para <i>FaMYC2</i> , <i>FabHLH33-2</i> , <i>FaMYB10-2</i> , <i>FabHLH3-2</i> , <i>FaJAM1</i> , <i>FaNINJA</i> , <i>FaJAZ1</i> , <i>FaJAZ8.1</i> , <i>FaJAZ9</i> y <i>FaJAZ10</i> en los vectores destino pGADT7 y pGBKT7.	203
Fig. S5.6. Controles negativos de levaduras co-transformadas con construcciones y vectores destino para los ensayos de doble híbrido de levadura.....	204

Capítulo 6: Discusión general.

Fig. 6.1. Modelo de las variaciones de jasmonatos durante el desarrollo y la maduración e interacciones de las proteínas JAZ con los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW.	220
---	-----

Resumen

Los jasmonatos (JAs) son fitohormonas que regulan respuestas frente a estrés y procesos del desarrollo. Su rol está bien elucidado en la planta modelo *Arabidopsis*, donde se ha determinado su participación en la acumulación de flavonoides como las antocianinas, a través de la regulación de las vías de biosíntesis y señalización. Concretamente, las proteínas JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) son represores centrales de la vía de transducción de los JAs mediante interacciones proteína-proteína, las cuales también regulan factores de transcripción (FTs) del complejo MYB-bHLH-WD40 (MBW) relacionados con la biosíntesis de proantocidininas (PAs) y antocianinas. Sin embargo, el papel de los JAs en especies de frutos no climáticos como la frutilla es poco conocido. Los objetivos de esta tesis fueron elucidar los niveles de JAs durante el desarrollo y maduración de frutos de *Fragaria × ananassa* Duch., así como la conservación de los componentes de la vía de señalización de los JAs y la actividad represora de las proteínas JAZ sobre componentes centrales de la vía de transducción de señales de los JAs y del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína. Para ello, se evaluaron los cambios en el contenido de JAs durante el desarrollo de los frutos de *F. × ananassa*, se identificaron los genes y proteínas de la vía de señalización de los JAs en *Fragaria vesca* L., y se estudiaron las interacciones proteína-proteína de las proteínas JAZ con los componentes centrales de la vía de señalización y del complejo MBW en *F. × ananassa*. La concentración de JAs mostró un alto nivel en floración y etapas tempranas del desarrollo del fruto, y disminuyó hacia la maduración, lo que estuvo acompañado de una reducción en la expresión de genes del metabolismo de los JAs. En *F. vesca* se identificaron los genes codificantes para JAZ y los factores de transcripción MYC2, cuya expresión exhibió un patrón de disminución similar a los niveles de JAs. A nivel de proteína, JAZ y MYC2 exhibieron un alto grado de conservación en dominios estructurales respecto a sus ortólogos en otras especies. Las interacciones proteína-proteína mostraron conservación de las dianas moleculares de las proteínas JAZ, dentro de los componentes de la vía de señalización de los JAs, sugiriendo la conservación funcional de la vía de señalización de los JAs en frutilla. Además, se identificó una nueva secuencia degron no canónica de FaJAZ1, la cual mostró funcionalidad para la percepción de los JAs, mediada por coronatina. Finalmente, los represores JAZ también interaccionaron con los FTs del complejo MBW, bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2, relacionados con la biosíntesis de PAs y antocianinas en frutilla. Globalmente, los resultados

sugieren que los JAs tendrían un rol funcional en estadios de desarrollo tempranos del fruto, que existe conservación funcional de su vía de señalización, y que los represores JAZ tendrían un rol como reguladores de los FTs relacionados con la biosíntesis de PAs y antocianinas en *F. × ananassa*.



Abstract

Jasmonates (JAs) are phytohormones regulating stress responses and developmental processes. The role of JAs is well known in *Arabidopsis*, in which they control flavonoid compounds accumulation like anthocyanins, through regulation of their biosynthesis and signaling pathways. Specifically, JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) proteins are central repressors of the JA-signaling pathway by protein-protein interactions, and these proteins also regulate transcription factors (FTs) of MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex related to proanthocyanidin (PAs) and anthocyanin biosynthesis. However, JAs role in non-climacteric fruits like strawberry is unknown. The aims of this thesis were to elucidate JAs levels during development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits, and the conservation of JA signaling pathway components, as well as repressor activity of JAZ proteins on key members of JA-signaling pathway and MBW complex by protein-protein interactions. For this purpose, JAs content changes were evaluated during *F. × ananassa* fruit development; genes and proteins of JA-signaling pathway were characterized in *Fragaria vesca* L., and protein-protein interactions between JAZ and components of JA-signaling pathway and MBW complex were studied in *F. × ananassa*. JA contents showed higher levels at flowering and early stages of fruit development, and next, levels decreased to ripening, accompanied of downregulation of JA metabolism-related gene expression. In *F. vesca*, JAZ and MYC2 encoding genes were characterized and their expression exhibited a decreasing profile similar to JA levels in *F. × ananassa*. JAZ and MYC2 showed high conservation level in structural domains at protein level, respect to their analysed orthologs. Protein-protein interactions showed conservation of JAZ molecular targets, which belonging to JA signaling pathway, indicating a functional conservation for this pathway in strawberry. Besides, a new non-canonical degron sequence for FaJAZ1 was identified, which showed functionality for JA perception, mediated by coronatine. Finally, JAZ repressors also interacted with TFs of MBW complex, bHLH3-2, bHLH33-2, MYB10-2, related to PAs and anthocyanin biosynthesis in strawberry. Globally, these results suggest that JAs would have a functional role at early development stages of strawberry fruits, a functional conservation of JA-signaling and a regulator role of JAZ repressors on TFs related to PAs and anthocyanin biosynthesis in *F. × ananassa*.

Capítulo 1:

Introducción general

1.1. La frutilla: generalidades e importancia comercial.

La frutilla (o fresa) pertenece al género *Fragaria* (tribu Potentilleae, subfamilia Rosoideae, familia Rosaceae), que agrupa a más de 20 especies (Folta & Davis, 2006; Xiang et al., 2017), siendo *Fragaria vesca* L. (frutilla silvestre), *Fragaria chiloensis* L. (frutilla chilena), *Fragaria virginiana* Duch. y *Fragaria* × *ananassa* Duch. (frutilla cultivada), algunas de las especies más representativas del género (Folta & Davis, 2006; Smith & Skog, 2003).

F. × ananassa es un híbrido entre *F. chiloensis* y *F. virginiana*, con múltiples variedades cultivadas (Folta & Davis, 2006; Smith & Skog, 2003), y una gran importancia económica que radica en una alta capacidad antioxidante, así como en sus beneficios sobre la salud humana (Hannum, 2004). La frutilla comercial es cultivada a nivel mundial, excepto en la Antártida, regiones árticas y tropicales, siendo el hemisferio norte el que agrupa la mayor producción (Smith & Skog, 2003), donde Estados Unidos de América es el mayor productor (1.390.000 toneladas), seguido de Egipto (435.344 toneladas) y España (397.369 toneladas) durante el año 2015 (Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2015). En Chile, fueron producidas 27.093 toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2015), donde la exportación de frutilla congelada representa el mayor porcentaje del mercado exterior (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2014).

La frutilla es considerada una especie modelo para el estudio del desarrollo y maduración de frutos no climatéricos (Cherian, Figueroa, & Nair, 2014). *F. vesca* es una especie diploide (2x), cuyo genoma ha sido secuenciado (Shulaev et al., 2011), y representa un subgenoma de la frutilla cultivada octoploide (x8) *F. × ananassa* (Liu, Poulsen, Davis, & Jenkins, 2016). Actualmente, estudios reportados en ambas especies han generado gran cantidad de información básica sobre la fisiología, metabolismo, genoma, transcriptoma y proteoma (Bianco et al., 2009; Hollender et al., 2014; Kang et al., 2013; Shulaev et al., 2011; Toljamo, Blande, Kärenlampi, & Kokko, 2016; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2011), necesaria para el conocimiento de los diferentes procesos implicados en el desarrollo y maduración de los frutos.

1.2. Desarrollo y maduración de frutos de frutilla.

El proceso de desarrollo y maduración de la frutilla, se completa aproximadamente 30 días post-antesis (Perkins-Veazie, 1996), generando un “falso fruto” constituido por el receptáculo y los aquenios (Smith & Skog, 2003), que contienen las semillas y se encuentran sobre la superficie del receptáculo conectados mediante haces vasculares al centro de este (Perkins-Veazie, 1996).

El proceso de formación del fruto (cuajado) se inicia a partir de la flor y tras la fertilización del óvulo, pudiendo dividirse en desarrollo temprano (aborto o inicio del desarrollo), divisiones celulares y expansión celular, siendo estos procesos regulados por diferentes hormonas (Cherian et al., 2014; Kumar, Khurana, & Sharma, 2014; Nitsch, 1950; Smith & Skog, 2003). La morfología y características del desarrollo de los frutos están determinadas por la variedad y las condiciones ambientales, principalmente temperatura y fotoperiodo (Smith & Skog, 2003). El fruto pasa por diferentes estadios de desarrollo (verde, blanco, transición) hasta la maduración completa (estadio rojo), que implica cambios en las características físico-químicas y que finaliza con la senescencia del fruto (Manning, 1993; Perkins-Veazie, 1996). Los cambios que ocurren durante este proceso son: aumento de tamaño, acumulación de sólidos solubles, disminución de ácidos orgánicos, pérdida de firmeza, síntesis de compuestos volátiles, degradación de pigmentos y disminución/acumulación de compuestos fenólicos (Manning, 1993; Ornelas-Paz et al., 2013; Perkins-Veazie, 1996).

1.3. Cambios físico-químicos de los frutos durante el desarrollo y la maduración.

Durante los procesos de desarrollo y maduración, los frutos de frutilla sufren cambios físico-químicos que determinan sus características organolépticas y de calidad, siendo la pérdida de firmeza (ablandamiento), la acumulación de azúcares, la disminución de los ácidos orgánicos y la acumulación de compuestos fenólicos, algunos de los más destacados (Manning, 1993; Ornelas-Paz et al., 2013; Perkins-Veazie, 1996).

1.3.1. Firmeza.

La firmeza de los frutos disminuye hasta un 90% a medida que transcurren el desarrollo y la maduración, siendo más evidente durante la fase final de maduración y determinando la calidad del fruto frente al consumidor (Manning, 1993; Ornelas-Paz et al., 2013). Esta pérdida de firmeza o ablandamiento de los frutos viene determinada por la degradación y

solubilización de componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas) y la lámina mediana (Manning, 1993; Perkins-Veazie, 1996).

1.3.2. Azúcares y ácidos orgánicos.

El contenido de sólidos solubles (CSS) y la acidez titulable (AT) son dos parámetros de calidad de fruto, medidos por el contenido de azúcares y ácidos orgánicos, respectivamente, y la relación CSS/AT es una medida de la calidad y aceptabilidad de frutos por parte del consumidor (Manning, 1993; Perkins-Veazie, 1996). Los azúcares son los principales componentes del fruto maduro que aportan energía y dan sabor dulce, así la glucosa, fructosa y sacarosa representan más del 90% de los azúcares totales (Manning, 1993; Ornelas-Paz et al., 2013). Los ácidos orgánicos están directamente relacionados con el sabor, regulación del pH del fruto, así como con la regulación de la síntesis de pigmentos (Manning, 1993), disminuyendo su contenido a medida que transcurre el desarrollo y maduración (Perkins-Veazie, 1996). El ácido cítrico es el ácido orgánico mayoritario en frutos maduros, alcanzando más del 80% de los ácidos orgánicos totales (Ornelas-Paz et al., 2013; Perkins-Veazie, 1996), así mismo los ácidos málico y ascórbico (vitamina C) son otros ácidos representativos e importantes en los frutos de frutilla (Ornelas-Paz et al., 2013; Perkins-Veazie, 1996). A pesar de que el contenido en azúcares y ácidos orgánicos aumenta y disminuye, respectivamente, durante el desarrollo y la maduración del fruto, existen variaciones dependientes del cultivar (Ornelas-Paz et al., 2013).

1.3.3. Compuestos volátiles.

La presencia de compuestos volátiles determina el aroma y sabor de los frutos de frutilla (Manning, 1993). Alcoholes, ésteres, carbonilos y compuestos sulfurados, entre otros, constituyen una mezcla compleja que da lugar al aroma característico de los frutos de diferentes cultivares (Manning, 1993; Perkins-Veazie, 1996).

1.3.4. Pigmentos y compuestos fenólicos.

Los pigmentos presentes en los frutos tienen diferentes funciones como la atracción de predadores para la dispersión de las semillas, indicadores de maduración o funciones defensivas (Manning, 1993). Los frutos de estadios verdes tienen una síntesis activa de clorofila, que se detiene una vez que se alcanza el estadio blanco, y posteriormente se van acumulando antocianinas hasta la senescencia del fruto (Manning, 1993; Perkins-Veazie, 1996).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se dividen en cuatro clases principales: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides (flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles), estilbenos y lignanos (Gharras, 2009). Los flavonoides tienen diversas funciones en la planta, como el crecimiento y la defensa (Gharras, 2009), predominando en las hojas, flores y frutos (Gharras, 2009). Así mismo, a los flavonoides se les atribuyen diversos beneficios para la salud humana, tales como su capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana, entre otros (Gharras, 2009).

Las flavanoles pueden encontrarse en forma de monómeros llamados catequinas, o en forma de polímeros denominados proantocianidinas (PAs), y se encuentran en muchos tipos de frutos, entre ellos la frutilla (Aaby, Mazur, Nes, & Skrede, 2012; Buendía et al., 2010; Gharras, 2009). El contenido en PAs es elevado en las etapas iniciales del desarrollo de los frutos, y va disminuyendo progresivamente a medida que ocurre la maduración (Carbone et al., 2009; Schaart et al., 2013). Los niveles de catequinas y PAs han sido evaluados en diferentes cultivares de *F. × ananassa*, mostrando concentraciones variables en función del cultivar (Aaby et al., 2012; Buendía et al., 2010), y siendo la procianidina mayoritaria en concentración respecto a la catequina (Aaby et al., 2012). Por otro lado, las antocianinas son el tipo de flavonoide mayoritario en los frutos maduros, aportando la coloración roja y el poder antioxidante (Aaby et al., 2012; Buendía et al., 2010; Carbone et al., 2009; Hannum, 2004; Schaart et al., 2013). El tipo de antocianina mayoritaria en el fruto maduro es la pelargonidina-3-glucósido, seguido de la cianidina-3-glucósido, y al igual que en el caso de las PAs, el contenido de antocianinas varía dependiendo del cultivar (Aaby et al., 2012).

1.4. Biosíntesis de flavonoides: biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas en frutilla.

La vía fenilpropanoide es la encargada de generar los precursores para la biosíntesis de los flavonoides, y se inicia a partir del aminoácido fenilalanina, que es el producto final de la vía del ácido shikímico (Jaakola, 2013a; Vogt, 2010). El primer paso de la vía fenilpropanoide está catalizado por el enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), que genera por desaminación el ácido *trans*-cinámico, y a partir de este punto se suceden diversas reacciones enzimáticas de hidroxilaciones, que generan los sustratos para la biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos, lignanos, estilbenos, cumarinas y flavonoides (Jaakola, 2013a; Singh, Rastogi, & Dwivedi, 2010). La ruta de biosíntesis de los flavonoides se inicia por

combinación de malonil-CoA y cumarin-CoA en una reacción catalizada por la chalcona sintasa (CHS), generando como productos las chalconas, que a su vez generan las flavononas por medio de la chalcona isomerasa (CHI). A partir de estas, se generan las isoflavonas (Jaakola, 2013a). Las flavononas también dan lugar a los dihidroflavonoles, mediante una reacción catalizada por la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), y siendo estos precursores de los flavonoles (Dixon, Liu, & Jun, 2013; Jaakola, 2013a; 2013b; Singh, Rastogi, & Dwivedi, 2010). Finalmente, la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) cataliza la biosíntesis de leucoantocianidinas (Dixon et al., 2013; L. Jaakola, 2013a, 2013b; Singh et al., 2010). La biosíntesis de PAs comienza con la reducción de las leucoantocianidinas mediante la leucoantocinidina reductasa (LAR), produciendo los flavan-3-oles tipo catequina (Fig. 1.1A, Jaakola, 2013a; Vogt, 2010), o bien, las leucoantocinidinas dan lugar a las antocianidinas, en una reacción catalizada por la antocianidina sintasa (ANS), y que son precursoras de la epicatequina, por medio de la enzima antocianidina reductasa (ANR) (Fig. 1.1A, Jaakola, 2013a, 2013b; Schaart et al., 2013). Tanto las catequinas como las epicatequinas pueden polimerizarse y generar PAs (Fig. 1.1A, Jaakola, 2013a, 2013b; Schaart et al., 2013). Las antocianinas se biosintetizan a partir de las antocianidinas, en una reacción catalizada por la uridina difosfato-glucose:flavonoide 3-o-glucosiltransferasa (UFGT), generando glucósidos de cianidinas, delfinidinas y pelargonidinas (Fig. 1.1A, Jaakola, 2013a, 2013b; Schaart et al., 2013). En la frutilla, han sido caracterizados cada uno de los enzimas que regulan la biosíntesis de flavonoides, especialmente aquellos específicos de la regulación de la biosíntesis de PAs y antocianinas: LAR, ANS, ANR y UFGT (Almeida et al., 2007; Carbone et al., 2009; Schaart et al., 2013).

1.4.1. Regulación transcripcional de la biosíntesis de proantocianidinas y antocianinas en frutilla.

Los factores de transcripción (FTs) son reguladores de la expresión de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de flavonoides (Jaakola, 2013b). La vía es regulada por la interacción de factores de transcripción R2R3-MYB, bHLH y WD40, constituyendo el complejo conocido como MBW (Jaakola, 2013b). Los FTs WD40 tienen un rol estructural en la formación del complejo MBW, permitiendo la unión de los FTs bHLH y MYB, mientras que estos últimos regulan la activación de genes específicos por unión a regiones promotoras (Jaakola, 2013b).

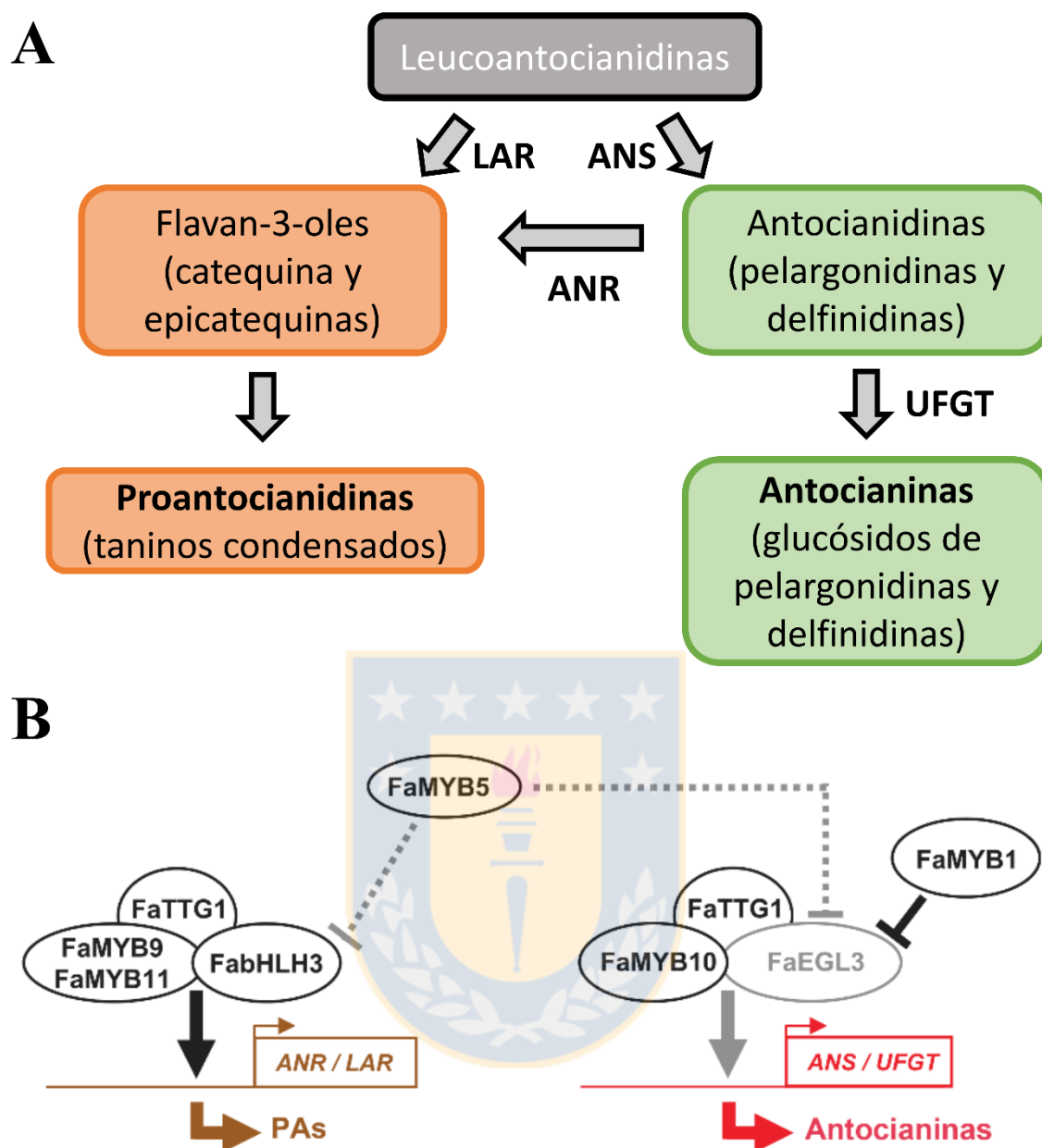


Fig. 1.1. Biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas. Ruta biosintética de PAs y antocianinas (A), y complejo MYB-bHLH-WD40 (MBW) regulador de la biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas (B). FaEGL3 se corresponde con FabHLH33 (Schaart et al. 2013). ANR, antocianidina reductasa; ANS, antocianidina sintasa; bHLH, basic helix-loop-helix; EGL3, ENHANCER OF GLABRA 3; LAR, leucoantocianidin reductasa; PAs, proantocianidinas; TTG1, TRANSPARENT TESTA GLABRA 1; UFGT, uridina difosfato-glucosa:flavonoide 3-o-glucosiltransferasa. Adaptado de Jaakola et al. 2013b; Modificado de Schaart et al., (2013).

El principal FT WD40 relacionado con la biosíntesis de PAs y antocianinas es TTG1, identificado inicialmente en *Arabidopsis thaliana* L. (Walker et al., 1999), y posteriormente, en *F. × ananassa* (Schaart et al., 2013). Los FTs MYB agrupan varias familias (Dubos et al., 2010), siendo la familia R2R3-MYB la relacionada con la regulación de la biosíntesis de flavonoides. Estos contienen repeticiones de dominios de unión al ADN, y son en su mayoría reguladores positivos de la biosíntesis de flavonoides, aunque han sido descritos algunos represores (Allan, Hellens, & Laing, 2008; Jaakola, 2013b). En *A. thaliana*, el FT R2R3-MYB denominado TRANSPARENT TESTA 2 (TT2) es el encargado de la biosíntesis de PAs (Baudry et al., 2004; Dubos et al., 2010; Nesi, Jond, Debeaujon, Caboche, & Lepiniec, 2001), mientras que PAP1 regula la biosíntesis de antocianinas (Shan, Zhang, Peng, Wang, & Xie, 2009). Los genes ortólogos de *AtTT2* han sido identificados en especies de la familia Rosaceae como *Malus × domestica* Borkh., donde *MYB9/11* regulan tanto la biosíntesis de PAs como de antocianinas (An et al., 2015), y en *F. × ananassa*, donde *MYB9/11* regulan de forma específica la biosíntesis de PAs (Fig. 1.1B., Schaart et al., 2013). El gen ortólogo de *AtPAP1* (*AtMYB75*) también ha sido caracterizado en otras especies, denominado *MYB10*, el cual regula la biosíntesis de antocianinas en varios miembros de la familia Rosaceae, tales como *M. × domestica*, *Pyrus communis* L. (Lin-Wang et al., 2010), *F. vesca* (Lin-Wang et al., 2014) y *F. × ananassa* (Fig. 1.1B, Medina-Puche et al., 2014; Schaart et al., 2013). Los FTs tipo MYB también pueden actuar como reguladores negativos de la biosíntesis de PAs y antocianinas, siendo MYB1 y MYB5 los mejor caracterizados en *F. chiloensis* y/o *F. × ananassa* (Fig. 1.1B, Almeida et al., 2007; Salvatierra, Pimentel, Moya-León, & Herrera, 2013; Schaart et al., 2013), sin embargo, existen resultados contradictorios acerca del rol represor de MYB1 sobre MYB10 (Fig. 1.1B, Lin-Wang et al., 2010; Medina-Puche et al., 2014). Finalmente, los FTs bHLH ('basic helix-loop-helix') contienen dominios de unión al ADN y se encuentran conservados en todas las especies de plantas (Pires & Dolan, 2010). Los FT bHLH relacionados con la biosíntesis de PAs y antocianinas en *A. thaliana* son TT8 y EGL3/GL3 (Nathalie Nesi et al., 2000; Petroni & Tonelli, 2011). Los bHLH implicados en la biosíntesis de flavonoides han sido identificados y caracterizados en *F. vesca* y *F. × ananassa* (Schaart et al., 2013; Zhao et al., 2018), y estos tienen genes diana comunes relacionados con la biosíntesis de PAs y antocianinas (Jaakola, 2013b). Específicamente, en *F. × ananassa*, los genes ortólogos de *AtTT8* y *AtEGL3/GL3* son *bHLH3* y *EGL3*, reguladores de la expresión de los enzimas ANR/LAR y ANS/UFGT necesarios para la biosíntesis de PAs y antocianinas, respectivamente (Fig. 1.1B., Schaart et al., 2013). El FT bHLH33 muestra una relación evolutiva cercana con el gen *AtEGL3*, siendo considerado el

miembro del complejo MBW que regula la biosíntesis de antocianinas (Lin-Wang et al., 2014).

En *F. × ananassa*, ha sido estudiada la funcionalidad de cada uno de los genes del complejo MBW (Fig. 1.1B, Lin-Wang et al., 2014; Medina-Puche et al., 2014; Schaart et al., 2013). La sobreexpresión heteróloga del gen *AtTTG1* en *F. × ananassa* disminuye la acumulación de antocianinas, mientras que induce un aumento en el contenido de PAs (Schaart et al., 2013). Sin embargo, TTG1 constituye tanto, el complejo regulador de PAs como el de antocianinas, y el rol predominante es la estabilización del complejo MBW, mediante la interacción con los FTs R2R3-MYB y bHLH (Fig. 1.1B, Schaart et al., 2013). La sobreexpresión de los genes ortólogos de *MYB9*, *MYB11* y *bHLH3* de *Arabidopsis* en *F. × ananassa*, al igual que *AtTTG1*, induce la acumulación de PAs y la reducción del contenido de antocianinas (Schaart et al., 2013). El silenciamiento de *FvMYB10* y *FaMYB10* provoca una reducción en el contenido de antocianinas en los frutos (Lin-Wang et al., 2010; Medina-Puche et al., 2014), mientras que la sobreexpresión de *FaMYB10* induce la acumulación de estas (Lin-Wang et al., 2010). Por otro lado, aunque *bHLH33* ha sido propuesto como el ortólogo de *AtEGL3*, y como un FT que regula la expresión de genes de biosíntesis de antocianinas, el silenciamiento de *bHLH33* en *F. vesca* no disminuye la acumulación de antocianinas en frutos, aunque en sistemas heterólogos de tabaco se ha demostrado un rol crucial de este gen en la biosíntesis de antocianinas (Lin-Wang et al., 2014).

1.5. Regulación hormonal del desarrollo y la maduración de frutos: una visión fisiológica.

Los cambios que ocurren durante el desarrollo y la maduración de frutos están controlados, en su mayor parte, por fitohormonas (Cherian et al., 2014; Kumar et al., 2014; McAtee, Karim, Schaffer, & David, 2013). Desde un punto de vista fisiológico, los frutos carnosos pueden ser clasificados como climatéricos (tomate, manzana, pera, etc.) y no climatéricos (frutilla, uva, limón, etc.), en función de si la respiración y los niveles de etileno aumentan o se mantienen en niveles constantes, respectivamente, durante la maduración (Cherian et al., 2014; Kumar et al., 2014; McAtee et al., 2013; Symons et al., 2012). Las hormonas que intervienen en el cuajado de los frutos y el crecimiento inicial de los mismos son comunes, en general, entre los diferentes tipos de frutos (Kumar et al., 2014; McAtee et al., 2013). Sin embargo, las diferencias vienen dadas por las hormonas que regulan el proceso de maduración, siendo el etileno el que regula la maduración de los frutos

climatéricos como el tomate (Cherian et al., 2014), mientras que la maduración de los frutos no climatéricos, como la frutilla, está controlada por el ácido abscísico (Chai, Jia, Li, Dong, & Shen, 2011; Jia et al., 2011; 2013, 2016). Por otro lado, existen diferencias en la ontogenia del fruto, el tomate es producto del engrosamiento del ovario, mientras que la frutilla se origina a partir del crecimiento del receptáculo (Kumar et al., 2014). Finalmente, el tomate y la frutilla son especies modelo usadas para el estudio del desarrollo y la maduración de frutos climatéricos y no climatéricos, respectivamente (Cherian et al., 2014).

1.5.1. Auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinosteroides en frutilla:

Las auxinas (AUXs) y giberelinas (GAs) son sintetizadas en los aquenios de la frutilla, y tienen un rol predominante en las etapas iniciales del crecimiento de los frutos (Kang et al., 2013). Las AUXs y GAs promueven la división y expansión celular del receptáculo, respectivamente (Csukasi et al., 2011; Nitsch, 1950). La eliminación de las AUXs de la superficie del receptáculo detiene el crecimiento de los frutos (Nitsch, 1950). En *F. x ananassa*, los niveles máximos de AUXs durante el desarrollo, se alcanzan en los estadios verdes (10-12 días post-antesis) y disminuyen hacia la maduración (Fig. 1.2., Symons et al., 2012). La aplicación de AUXs sobre frutos no climatéricos (frutilla y uva) inhibe la expresión de genes relacionados con el proceso de maduración, por lo tanto, parecen ser necesarias para evitar la maduración prematura de los frutos (Aharoni et al., 2002; Davies, Boss, & Robinson, 1997; Given, Venis, & Gierson, 1988; Trainotti, Pavanello, & Casadoro, 2005). Las GAs (GA_1 y GA_3) alcanzan sus mayores niveles en frutos de estadios verdes (aproximadamente 13-15 días post-anthesis), y posteriormente disminuyen en frutos maduros (Fig. 1.2., Csukasi et al., 2011; Symons et al., 2012), sin embargo, la GA_4 tiene niveles elevados en estadio blanco, sugiriendo un rol predominante en la transición de estadio blanco a estadio maduro (Csukasi et al., 2011). Además, la aplicación de GAs retrasa la maduración de los frutos (Martínez, Chaves, & Añón, 1996). Kang et al. (2013) reportaron que la biosíntesis de GAs y AUXs ocurren en el embrión de los aquenios, y las cuales son transportadas al receptáculo donde inducen el crecimiento del receptáculo.

Las citoquininas (CKs) se relacionan con el desarrollo temprano de los frutos no climatéricos (Kang et al., 2013; Kumar et al., 2014), sin embargo, en frutilla no está claro el rol de estas hormonas, asociándose principalmente a la inducción floral (Eshghi & Tafazoli, 2007). Finalmente, los brasinosteroides (BRs) tiene niveles elevados en la floración y bajos en los estadios de fruto maduro, sugiriendo un rol predominante en el desarrollo inicial y

cuajado de los frutos (Fig. 1.2., Symons et al., 2012), sin embargo también se les atribuye una función importante en el proceso de maduración de los mismos (Bombarely et al., 2010).

1.5.2. Ácido abscísico y etileno.

El ácido abscísico (ABA) es la principal hormona que regula la maduración de frutos no climatéricos como la frutilla (Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; 2013; 2016; Symons et al., 2012), donde también participa la sacarosa (Jia et al., 2013; 2016). En los frutos de frutilla, el ABA se acumula principalmente en los achenios (Symons et al., 2012), y los niveles de ABA durante el desarrollo y la maduración (Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; Symons et al., 2012), son opuestos a los de AUXs, GAs y BRs (Fig. 1.2., Symons et al., 2012), y coincidentes con el aumento en la acumulación de antocianinas (Chai et al., 2011; Jia et al., 2011). Por lo tanto, el ABA es considerada la fitohormona que promueve la maduración de frutilla, induciendo la acumulación de antocianinas en los frutos (Chai et al., 2011; Jia et al., 2011; 2013). La aplicación exógena de ABA a frutos de *F. x ananassa* cv. Everest desencadena por una parte un ablandamiento de los frutos, y por otra parte, un aumento de coloración por acumulación de antocianinas (Jiang & Joyce, 2003; Symons et al., 2012), lo que es consecuencia directa de la activación de la vía fenilpropanoide, ya que se ha observado un incremento en la actividad enzimática del enzima PAL (Jiang & Joyce, 2003). El enzima 9-cis epoxicarotenoid dioxygenasa (NCED) es clave en la ruta de biosíntesis del ABA, y el silenciamiento transiente de *FaNCED1* y el tratamiento con fluridona (un inhibidor de la biosíntesis de ABA), confirma el rol del ABA, ya que inhibe el desarrollo y la coloración de los frutos (Jia et al., 2011).

El etileno (ET) es la fitohormona que promueve la maduración de frutos climatéricos como el tomate (Cherian et al., 2014; Kumar et al., 2014), sin embargo, su rol en los frutos de frutilla no ha sido completamente elucidado, y es controvertido. La respiración en frutos de frutilla permanece constante durante el desarrollo y la maduración (Given, Venis, & Gierson, 1988), pero los niveles de ET en estadios verdes y maduros se incrementan (Fig. 1.2., Iannetta et al., 2005; Sun et al., 2013), y existe expresión génica activa de los enzimas encargados de la biosíntesis de ET, tanto en receptáculos como en achenios (Trainotti et al., 2005). Los tratamientos de frutos de frutilla con ET, promueven la actividad de PAL y la acumulación de antocianinas, mientras que el uso de 1-metilciclopropano (1-MCP, inhibidor de la percepción de ET) promueve una reducción en los niveles de la actividad enzimática de PAL y la disminución en el contenido de antocianinas (Villarreal, Bustamante, Civello, & Martínez, 2010).

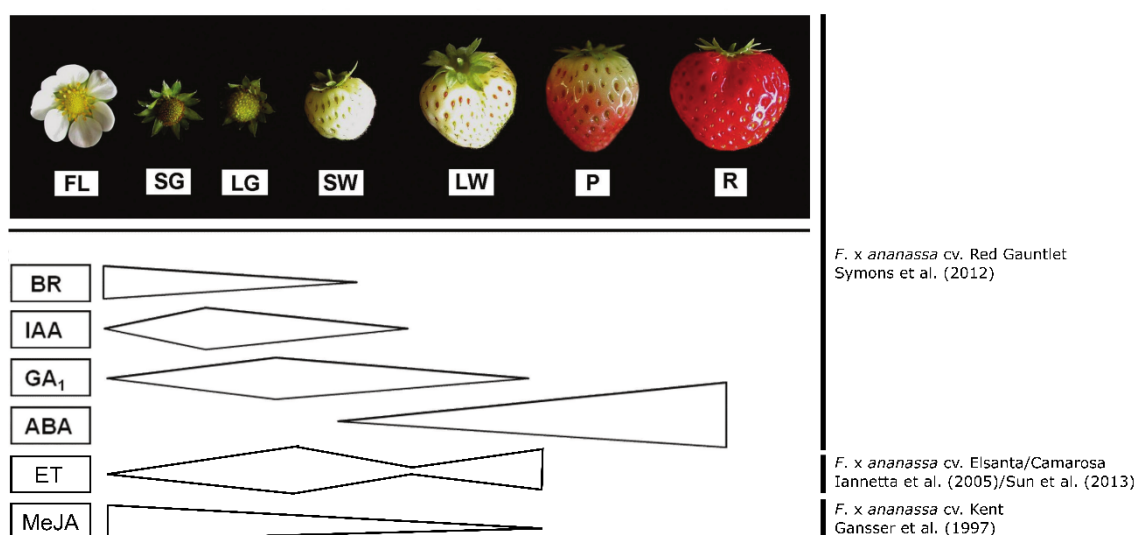


Fig. 1.2. Cambios en el contenido de fitohormonas durante el desarrollo y maduración de *Fragaria* × *ananassa*. Estadios de desarrollo: FL, flor; SG, verde pequeño; LG, verde grande; SW, blanco pequeño; LW, blanco grande; P, transición; R, maduro. ABA, ácido abscísico; BR, brasinosteroides; ET, etileno; GA, giberelinas; IAA, auxinas; MeJA, metil jasmonato. Modificado de Gansser, Latza, & Berger, (1997); Iannetta et al., (2005); Sun et al., (2013); Symons et al., (2012).

1.5.3. Jasmonatos.

Los jasmonatos (JAs) son un conjunto de fitohormonas, de las que poco se conoce su rol en los procesos de desarrollo y maduración de frutos. En frutos climatéricos como manzana, los niveles de JAs (ácido jasmónico, JA, y metil jasmonato, MeJA) aumentan con el transcurso del desarrollo, alcanzando niveles más elevados en frutos maduros (Fan, Mattheis, & Fellman, 1998). Por el contrario, en frutos no climatéricos como la frutilla, los niveles de MeJA disminuyen desde los estadios verdes hacia la maduración (Fig. 1.2., Gansser et al., 1997). Recientemente, jasmonato-isoleucina (JA-Ile) ha sido reportado como el JA bioactivo en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2009), y los niveles de este y de JA disminuyen durante el desarrollo de frutos no climatéricos de *V. vinífera*, sugiriendo un rol principal en el desarrollo temprano de los frutos de uva (Böttcher, Burbidge, di Rienzo, Boss, & Davies, 2015). Sin embargo, los efectos mejor conocidos de los JAs, son atribuidos a la aplicación de MeJA exógeno sobre frutos de *F. × ananassa* y *F. chiloensis*, y se ha relacionado principalmente con el etileno, cambios de coloración y la acumulación de antocianinas (Concha et al., 2013; Pérez, Sanz, Olías, & Olías, 1997). Pérez et al. (1997) reportaron un aumento de la tasa respiratoria de frutos de *F. × ananassa* cv. Kent y un

incremento transiente de los niveles de etileno por aplicación de MeJA. Además, MeJA induce una acumulación en el contenido de antocianinas (Pérez et al., 1997). Resultados similares fueron observados en *F. chiloensis*, donde la aplicación exógena de MeJA incrementa la coloración del fruto y el aumento en el contenido de antocianinas (Concha et al., 2013). A su vez, la aplicación de MeJA aumenta la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides, etileno y JAs (Concha et al., 2013), sugiriendo un rol regulador de la maduración por parte de los JAs.

1.6. Jasmonatos: efectos fisiológicos, metabolismo y vía de señalización.

Los JAs son fitohormonas que están distribuidos ampliamente en las plantas terrestres (Han, 2017; Wasternack & Song, 2017), y tienen diversos roles tales como en el desarrollo y abscisión de las flores, desarrollo de las semillas, senescencia, defensa frente a estrés biótico y abiótico (hídrico y salino), inhibición del crecimiento y regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Huang et al., 2016; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack, 2014; Yuan & Zhang, 2015). Como se mencionó anteriormente, los JAs endógenos parecen tener un rol en el desarrollo temprano de los frutos (Böttcher et al., 2015; Gansser et al., 1997), mientras que la aplicación de JAs promueve cambios de coloración y acumulación de antocianinas en frutos de *F. × ananassa* y *F. chiloensis* (Concha et al., 2013; Pérez et al., 1997), aunque la función de los mismos no ha sido completamente elucidada.

1.6.1. Metabolismo y actividad biológica de los jasmonatos.

Desde un punto de vista químico, los JAs son oxilipinas derivados de la oxidación de galactolípidos (Wasternack & Strnad, 2018; Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Kombrink, 2010; Wasternack & Song, 2017; Wasternack & Strnad, 2017). La biosíntesis se inicia en los plastidios, por liberación de ácido α -linolénico (α -LA) a partir de galactolípidos de membrana, en una reacción catalizada por la fosfolipasa A1. El α -LA es el sustrato de la enzima 13-lipoxigenasa (13-LOX), que genera ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico (13-HPOT). Posteriormente, los enzimas aleno oxido sintasa (AOS) y aleno oxido ciclasa (AOC), generan ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), el cual es translocado al peroxisoma y por acción de la 12-oxo-fitodienoico reductasa 3 (OPR3) y varios ciclos de β -oxidación se produce ácido jasmónico (JA) (Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Kombrink, 2010; Wasternack & Song, 2017; Wasternack & Strnad, 2017). A partir del JA, mediante metilaciones, glicosilaciones, hidroxilaciones y conjugaciones de aminoácidos, entre otros,

se generan diferentes metabolitos con diferentes funciones en la homeostasis de los JAs (Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Kombrink, 2010; Wasternack & Song, 2017). La metilación del JA genera metil jasmonato (MeJA) en una reacción catalizada por la ácido jasmónico metiltransferasa (JMT; Fig. 1.3.A; Seo et al., 2001; Wasternack & Kombrink, 2010), y la conjugación de JA con Ile en el citoplasma, catalizado por la ácido jasmónico amido sintetasa 1 (JAR1), genera JA-Ile (Fig. 1.3.A; Staswick & Tiryaki, 2004; Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Song, 2017). El conjugado (+)-7-iso-JA-Ile ha sido reportado como el JA con mayor actividad biológica (Fonseca et al., 2009), y este es translocado del citoplasma al núcleo mediante el transportador JAT1 (Li et al., 2017; Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Strnad, 2017) donde activa la vía de señalización de JAs. La actividad biológica de los JAs viene determinada por la estructura de la molécula, un grupo ceto en el anillo de pentanona, cadena lateral con un grupo pentenil, metilación del grupo éster, la conjugación con aminoácidos y los diferentes enantiómeros (Fig. 1.3.A; Wasternack & Kombrink, 2010). La coronatina (COR) es una fitoxina producida por la bacteria *Pseudomonas syringae*, con una estructura análoga al JA-Ile, y que actúa mimetizando su función (Fig. 1.3.B; Staswick & Tiryaki, 2004), activando la vía de señalización de los JAs y reprimiendo la vía de señalización del ácido salicílico (SA), encargado de activar la respuesta inmune frente a patógenos y herbívoros (Zheng et al., 2012).

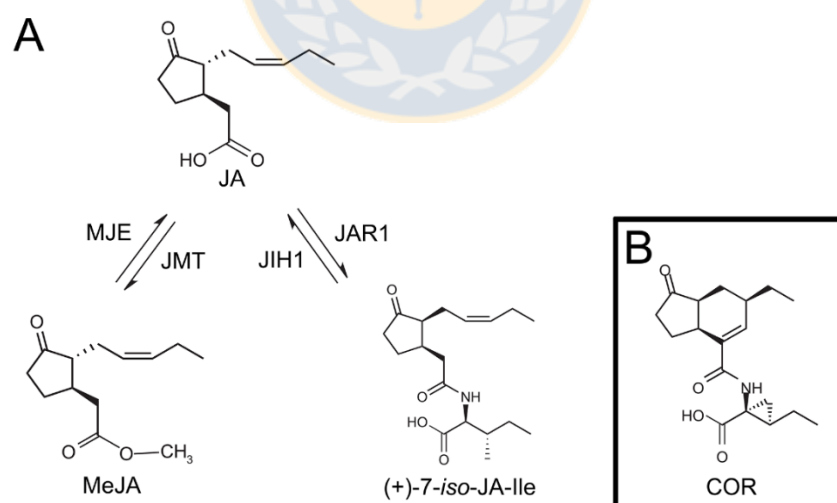


Fig. 1.3. Estructura y biosíntesis de jasmonatos. (A) Biosíntesis de metil jasmonato (MeJA) y (+)-7-iso-JA-Ile a partir de ácido jasmónico (JA). Estructura de la fitotoxina coronatina (COR). Adaptado de Fonseca et al., (2009).

El MeJA y la molécula bioactiva JA-Ile pueden hidrolizarse por acción de los enzimas MeJA esterasa (MJE; Fig. 1.3.A; Koo, Yoon, Seo, Kim, & Choi, 2013)) y JA-Ile hidrolasa 1 (JIH1; Fig. 1.3.A; Woldemariam, Onkokesung, Baldwin, & Galis, 2012), respectivamente, generando JA. Por otro lado, el JA-Ile puede ser inactivado mediante oxidaciones catalizadas por citocromos P450 de la familia CYP94, generando 12-hidroxi-JA-Ile (12OH-JA-Ile) y 12-carboxi-JA-Ile (12-COOH-JA-Ile) disminuyendo la respuesta a JAs (Koo, Cooke, & Howe, 2011; Widemann et al., 2013).

1.6.2. Vía de señalización de los jasmonatos.

Las plantas integran señales ambientales y estímulos endógenos, para responder ante cambios en el ambiente mediante la activación de las vías de señalización hormonales. Así los JAs son moléculas señal que participan en la reprogramación del crecimiento y reproducción, respuestas a estrés abiótico y biótico y biosíntesis de metabolitos secundarios (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; De Geyter, Gholami, Goormachtig, & Goossens, 2012; Pérez & Goossens, 2013; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017; Yuan & Zhang, 2015). Los componentes de la vía de señalización de los JAs son bien conocidos en la planta modelo *A. thaliana* (Chini et al., 2016; Wasternack & Song, 2017), sin embargo, en otras especies como la frutilla son desconocidos.

La vía de señalización de los JAs tiene una alta similitud con la de las AUXs (Pérez & Goossens, 2013; Shan, Yan, & Xie, 2012), y se ha propuesto una cercanía evolutiva entre ambas, ya que comparten elementos comunes como son: co-receptores de la misma familia, proteínas co-represoras similares (Han, 2017; Pérez & Goossens, 2013), y la formación de conjugados de AUX y JA, catalizada por la misma familia de enzimas GH3, sin embargo, a diferencia de los JAs conjugados, los de AUXs son inactivos (Han, 2017). La vía de señalización de los JAs se cree surgió a partir de una modificación de la vía de las AUXs, posterior a la aparición de las plantas terrestres (Han, 2017).

1.6.3. Percepción: el complejo co-receptor SCF^{COI1}-JAZ.

Los estímulos ambientales y endógenos promueven la activación de la biosíntesis de JA-Ile bioactivo (Chini et al., 2016), y su acumulación induce las respuestas a JAs mediante la activación de la vía de señalización (Chini et al., 2016; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017). El JA-Ile es percibido por la interacción entre la proteína F-box CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1), que forma parte del complejo ubiquitin ligasa Skp-Cullin-F-box-type E3 (SCF^{COI1}); (Fig. 1.4.; Xie, Feys, James, Nieto-Rostro, & Turner,

1998), y las proteínas JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ; (Fig. 1.4.; Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), formando el complejo co-receptor COI1-JA-Ile-JAZ (Fig. 1.4.; Sheard et al., 2010). Como consecuencia, ocurre la ubiquitinación de las proteínas JAZ, su degradación por el proteasoma 26S y la activación de las respuestas a JAs (Fig. 1.4.; Chini et al., 2007; Chini et al., 2016; Thines et al., 2007). Por otro lado, las proteínas JAZ interactúan directamente con los FTs MYC2, MYC3, MYC4 y MYC5, que son los activadores de la vía de señalización de los JAs (Fig. 1.4.; Chini et al., 2016; Dombrecht et al., 2007; Fernández-Calvo et al., 2011; Lorenzo, Chico, Sánchez-Serrano, & Solano, 2004; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017; Zhang et al., 2015).

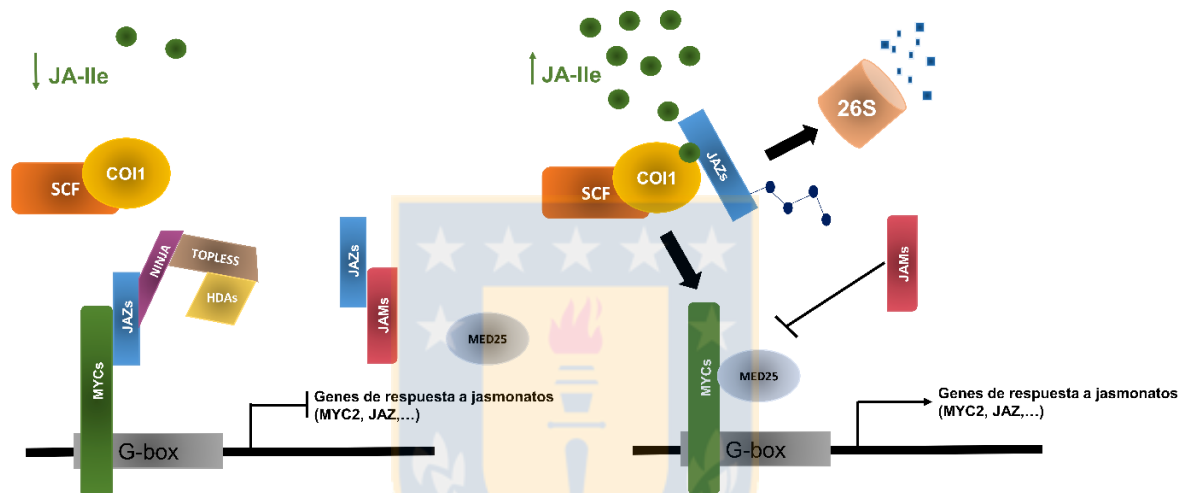


Fig. 1.4. Vía de señalización de jasmonatos. Adaptado de (Wasternack & Song, 2017). 26 S, proteasoma 26 S; COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; HDAs, histone deacetylases; JA-Ile, jasmonato isoleucina; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like; JAZ, JASMONATE-ZIM DOMAIN; NINJA, Novel Interactor of JAZ; SCF, Skp-Cullin-F-box-type E3.

1.6.4. Co-represores: NINJA, TOPLESS, HDAs.

Junto con las proteínas JAZ, que son los principales represores de la vía de señalización de los JAs (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), existen otros componentes que forman un gran complejo represor de los FTs, donde las proteínas JAZ actúan como iniciadores de la formación del complejo (Pauwels & Goossens, 2011). La proteína adaptadora NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA) interactúa por un extremo con las proteínas JAZ, y por el otro con los co-represores TOPLESS (TPL) (Fig. 1.4.; Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011). A su vez, las proteínas TPLs reclutan histonas

deacetilasas (HDAs) que reprimen la expresión génica (Fig. 1.4.; Long, Ohno, Smith, & Meyerowitz, 2006; Pérez & Goossens, 2013).

1.6.5. Factores transcripción activadores de la señalización de JAs: MYCs.

MYC2 fue el primer FT tipo bHLH identificado que regula la vía de señalización de los JAs (Dombrecht et al., 2007; Lorenzo et al., 2004). Posteriormente, MYC3 y MYC4 fueron identificados como FTs redundantes en la función de MYC2 (Fernández-Calvo et al., 2011). Recientemente, MYC5 también se ha relacionado con la activación de la respuesta temprana a JAs (Figueroa & Browse, 2015). Además, los FTs MYCs son necesarios para la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis* (Lorenzo et al. 2004; Dombrecht et al. 2007). Estos FTs tienen dominios de unión a las regiones promotoras G-box de genes de respuesta temprana a JAs (Fig. 1.4.; Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012, 2015), y son regulados por las proteínas JAZ mediante interacciones proteína-proteína, que inhiben su actividad transcripcional (Fernández-Calvo et al., 2011). Por otro lado, la subunidad MED25 es requerida para la activación de la transcripción por parte del FT MYC2 (Fig. 1.4.; Chen et al., 2012). Entre los genes de respuesta temprana a JAs activados por MYC2 se encuentran los que codifican para FTs MYC2 y represores JAZ (Wasternack & Hause, 2013).

1.6.6. Factores transcripción que reprimen la señalización de JAs: JAMs.

La vía de señalización de los JAs también se encuentra regulada, junto con los represores JAZ, por un grupo de FTs tipo bHLH denominados JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE (JAMs, (Fig. 1.4.; Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), junto con un cuarto denominado bHLH14 (Song et al., 2013). En *A. thaliana* han sido identificados 4 FT que regulan negativamente la vía de señalización (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Song et al., 2013) nombrados como JAM1 (bHLH017), JAM2 (bHLH013), JAM3 (bHLH003) y bHLH014, y que tienen actividad antagónica a los FT MYC2, por unión competitiva a las regiones promotoras G-box (Fig. 1.4.; Fonseca et al., 2014; Song et al., 2013).

1.6.7. Dominios y motivos proteicos de los componentes de la vía de señalización de JAs.

Los dominios proteicos son las unidades estructurales y funcionales de las proteínas, que permiten las interacciones proteína-proteína (Itzhaki, Akiva, Altuvia, & Margalit, 2006). A

su vez, los dominios pueden constar de subregiones conservadas denominadas motivos, considerándose transientes aquellas interacciones mediadas por motivos, mientras que las mediadas por dominios son más estables (Itzhaki, Akiva, Altuvia, & Margalit, 2006). Las proteínas de la vía señalización de los JAs (JAZ, MYCs, NINJA, etc.) tienen dominios y motivos con diferentes grados de conservación que median las interacciones proteína-proteína (Chini et al., 2007; Fernández-Calvo et al., 2011; Fonseca et al., 2014; Goossens, Swinnen, Vanden Bossche, Pauwels, & Goossens, 2015; Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011; Sheard et al., 2010; Vanholme, Grunewald, Bateman, Kohchi, & Gheysen, 2007; Zhang et al., 2015).

La subfamilia de proteínas JAZ pertenece a la familia TIFY, caracterizada por poseer el dominio conservado TIFY (ZIM; Fig. 1.5.; Vanholme et al., 2007), que a su vez contiene el motivo TIF[F/Y]XG con un alto grado de conservación (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Vanholme et al., 2007). En *Arabidopsis* han sido identificadas un total de 13 proteínas JAZ (Chini et al., 2016), de las cuales solo una carece del dominio TIFY (Thireault et al., 2015). El dominio TIFY permite la interacción con el adaptador NINJA (Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011), así como la formación de homo- y heterodímeros entre proteínas JAZ (Chini, Fonseca, Chico, Fernández-Calvo, & Solano, 2009; Pauwels & Goossens, 2011). En la región carboxilo terminal contiene el dominio conservado Jas, que comienza con la secuencia degron conservada LPIAR(R/K), necesaria para la interacción con COI1 y la degradación de las proteínas JAZ (Fig. 1.5.; Sheard et al., 2010; Shyu et al., 2012). Sin embargo, algunas proteínas como JAZ8 carecen de este degron (Fig. 1.5.; Shyu et al., 2012). A continuación, posee un motivo conservado SL-X₂-F-X₂-KR-X₂-R (Pauwels & Goossens, 2011) con aminoácidos implicados en la interacción con los FT MYCs (Zhang et al., 2015), y la secuencia de señalización nuclear X₅-PY-X₂ (Fig. 1.5.; NLS), requerida para localización de estas proteínas en el núcleo (Grunewald et al., 2009). Finalmente, las proteínas JAZ contienen en la región N-terminal el dominio “Cryptic MYC2-Interacting Domain” (CMID), con bajo grado de conservación y un motivo “ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression domain-like” (EAR-like), implicado en la interacción de JAZ-MYC (Fig. 1.5.; Goossens et al., 2015).

Los FT MYCs son reguladores maestros de las respuestas a JAs (Goossens, Mertens, Goossens, & Napier, 2017; Kazan & Manners, 2013) que contienen en su estructura proteica dos dominios altamente conservados, el dominio de unión al ADN bHLH y el dominio JAZ INTERACTION DOMAIN (JID; Fig. 1.5.; Fernández-Calvo et al., 2011). Como parte de este dominio de interacción JID, MYC2 contiene el dominio de transactivación (TAD), el

cual interacciona con la subunidad MED25 para la expresión de genes de respuesta a JAs (Fig. 1.5.; Çevik et al., 2012; Chen et al., 2012; Goossens et al., 2017; Kazan & Manners, 2013). También existen en la estructura de MYC2 un conjunto de secuencias que se corresponden con dominios NLS, para la localización nuclear de estos FTs (Fig. 1.5.; Kazan & Manners, 2013). Las proteínas JAZ reprimen a los FT MYCs mediante la interacción entre los dominios Jas y JID, respectivamente (Fernández-Calvo et al., 2011). Por otro lado, los antagonistas JAMs tienen conservados el dominio JID y bHLH, siendo de igual forma inhibidos por los represores JAZ (Fig. 1.5.; Fonseca et al., 2014; Goossens et al., 2017; Song et al., 2013), pero carecen del dominio TAD, ejerciendo un efecto antagónico a los factores de transcripción MYC2 (Fig. 1.5.; Fonseca et al., 2014; Goossens et al., 2017).

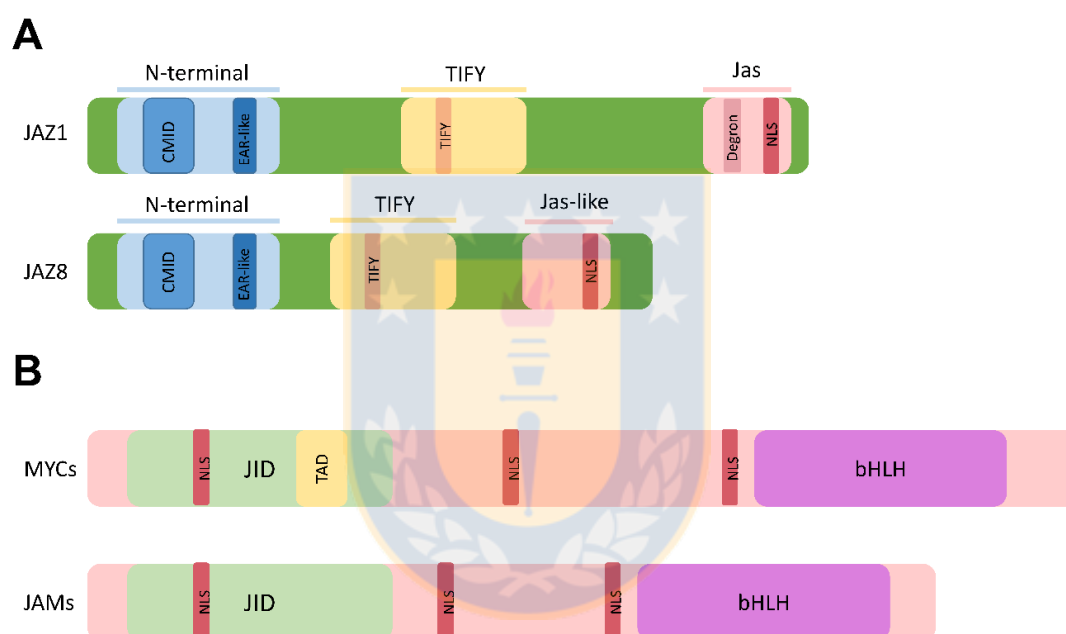


Fig. 1.5. Dominios estructurales y funcionales de las proteínas de la vía de señalización de los jasmonatos. (A) Dominios y motivos de las proteínas JAZ y (B) de los FTs de transcripción MYCs y JAMs. Adaptado de (Chini et al., 2016; Kazan & Manners, 2013).

La proteína adaptadora NINJA permite la unión de los co-represores TOPLESS, al sistema de represión iniciado por las proteínas JAZ cuando estas permanecen unidas a los FTs MYC2 ((Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011). NINJA tiene tres dominios conservados denominados A, B y C (Pauwels et al., 2010), donde el dominio A contiene un motivo EAR, responsable de la interacción con las proteínas TOPLESS (Pauwels et al., 2010). Por otro lado, el dominio C permite la interacción de NINJA con el dominio TIFY de los represores JAZ (Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011).

1.7. Las proteínas JAZ como reguladores de la vía de señalización de JAs y la biosíntesis de PAs y antocianinas.

Las proteínas JAZ regulan tanto la percepción de los JAs, como FTs implicados en defensa, inhibición del crecimiento, biosíntesis de metabolitos secundarios (antocianinas, glucosinolatos, etc.), floración, senescencia, entre otros (Chini et al., 2016; Goossens et al., 2017; Wasternack & Song, 2017). Debido a su importancia como regulador de defensa, crecimiento y metabolismo, se han identificado y caracterizado los represores JAZ en diversas especies como *A. thaliana*, *Oryza sativa* L., *Vitis vinífera* L., *M. × domestica* y *Solanum lycopersicum* L., entre otras (Chini et al., 2007; Chini, Ben-Romdhane, Hassairi, & Aboul-Soud, 2017; Thines et al., 2007; Ye, Du, Tang, Li, & Xiong, 2009; Zhang et al., 2012).

Cuando los niveles de JA-Ile se mantienen bajos, los represores JAZ están encargados de reprimir los factores de transcripción MYC2, y formar el complejo represor que inhibe la activación de las respuestas a JAs (Chini et al., 2016; Wasternack & Song, 2017). Sin embargo, ante un estímulo ambiental o interno, los niveles de JA-Ile aumentan, siendo percibido por el co-receptor COI1 y permitiendo la unión de las proteínas JAZ y su degradación, que conlleva a la liberación de los FTs MYC2 y activación de la respuesta a JAs (Chini et al., 2016; Wasternack & Song, 2017).

Cuando los niveles de JAs son bajos, los represores JAZ interaccionan con los FTs MYC2 y con la proteína adaptador NINJA (Fernández-Calvo et al., 2011; Pauwels et al., 2010). La interacción con NINJA ocurre por unión entre el dominio C y el dominio TIFY de las proteínas JAZs (Pauwels et al., 2010). Por otro lado, el mecanismo por el que las proteínas JAZ reprimen a los FTs MYC2 (Fig. 1.6.; Fernández-Calvo et al., 2011), es similar al observado para los FTs JAMs (Fig. 1.6.; Fonseca et al., 2014), así como para FTs tipo bHLH y MYB del complejo MBW (Fig. 1.6.; Qi et al., 2011). En *Arabidopsis*, la interacción JAZ-MYC2 (Chini et al., 2007), está mediada por los dominios Jas y JID, respectivamente (Fernández-Calvo et al., 2011). De igual forma, se ha reportado que los FTs MYC3 y MYC4, redundantes con MYC2 (Chini et al., 2016; Fernández-Calvo et al., 2011), interaccionan con la mayor parte de las proteínas JAZ (Fernández-Calvo et al., 2011), mientras que MYC5 solo interacciona solo con algunos de los represores JAZ (Qi, Huang, Song, & Xie, 2015). Se ha propuesto que los FTs JAMs, con función antagónica de los MYCs, son represores transcripcionales relacionados con la biosíntesis de antocianinas (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Qi et al., 2015; Sasaki-Sekimoto et al., 2013; Song

et al., 2013), y los represores JAZ se encargan de regularlos mediante interacción proteína-proteína a través del dominio Jas que se une al dominio JID conservado en los JAMs (Fig. 1.6.; Fonseca et al., 2014; Song et al., 2013). De las 12 proteínas JAZ, solo AtJAZ1/9/11 interaccionan con proteínas JAM1, JAM2 y JAM3, lo que sugiere que los represores JAZ son más restrictivos en la interacción comparado con los FTs MYCs (Fernández-Calvo et al., 2011; Fonseca et al., 2014). Hasta el momento, interacciones entre las proteínas JAZ y otros componentes de la vía de señalización de JAs, no han sido reportados en frutilla.

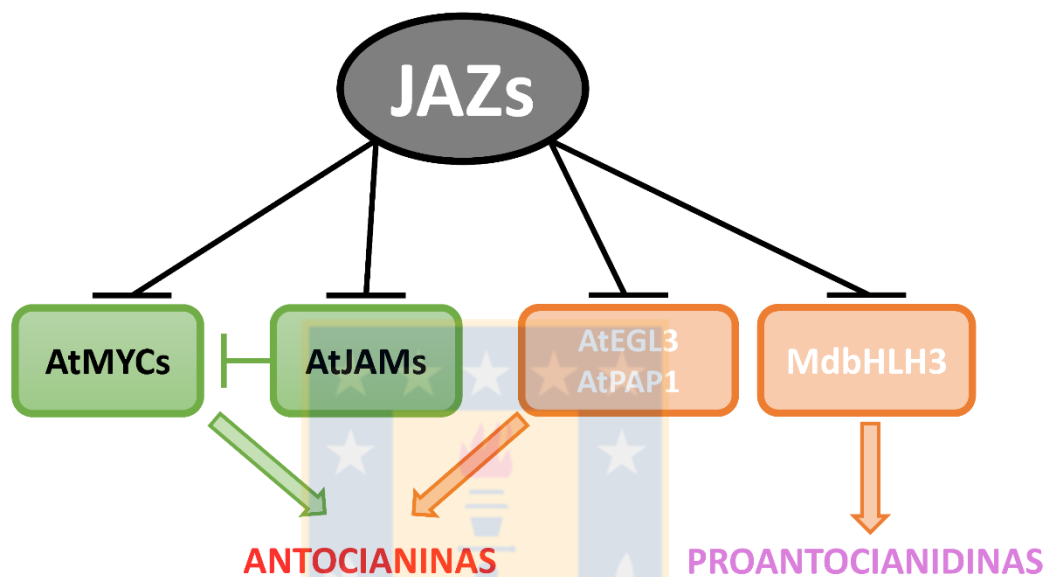


Fig. 1.6. Interacciones proteína-proteína de los represores JAZ con los componentes de la vía de señalización de JAs y factores de transcripción del complejo MBW de la biosíntesis de PAs y antocianinas en *Arabidopsis* y *Malus × domestica*. Los componentes de la vía de señalización de JAs y de la biosíntesis de antocianinas se muestran en verde y naranja, respectivamente. Adaptado de (An et al., 2015; Fernández-Calvo et al., 2011; Fonseca et al., 2014; Qi et al., 2011). EGL3, ENHANCER OF GLABRA 3; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; PAP1, PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1.

Los represores transcripcionales JAZ también regulan FTs pertenecientes al complejo MBW, encargado de la biosíntesis de antocianinas en *Arabidopsis* (Fig. 1.6.; Chini et al., 2016; Goossens et al., 2017; Qi et al., 2011) y PAs en *M. × domestica* (Fig. 1.6.; An et al., 2015). Específicamente, todas las proteínas AtJAZ, excepto AtJAZ3, AtJAZ4, AtJAZ7 y AtJAZ12 interaccionan con AtEGL3 y AtGL3, a través de los dominios Jas y JID,

respectivamente (Qi et al., 2011), los cuales son genes ortólogos de bHLH33 de *F. × ananassa*, que regula la biosíntesis de antocianinas (Lin-Wang et al., 2014). El FT AtPAP1 (AtMYB75), ortólogo de FaMYB10 (Lin-Wang et al., 2014) es regulado únicamente por AtJAZ1, AtJAZ8 y AtJAZ11 (Fig. 1.6.; Qi et al., 2011). Recientemente, ha sido reportado que JAZ2, JAZ3 y JAZ8 interactúan con bHLH3 en *M. × domestica* (Fig. 1.6.; An et al., 2015), ortólogo de AtTT8 y FabHLH3 (Schaart et al., 2013), el cual se ha relacionado con la acumulación de PAs en manzana (An et al., 2015). Sin embargo, las proteínas JAZ no interactúan con MYB9 y MYB11, MYB relacionados a síntesis de PAs en manzana (An et al., 2015). Finalmente, la actividad represora de JAZs sobre reguladores negativos MYB1 y MYB5, del complejo MBW, es desconocida.

1.8. Referencias bibliográficas.

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., & Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132(1), 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>
- Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Broeck, H. C. V. D., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Bois, G., ... O'Connell, A. P. (2002). Novel Insight into Vascular, Stress, and Auxin-Dependent and -Independent Gene Expression Programs in Strawberry, a Non-Climacteric Fruit. *Plant Physiology*, 129(3), 1019-1031. <https://doi.org/10.1104/pp.003558>
- Allan, A. C., Hellens, R. P., & Laing, W. A. (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, 13(3), 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.012>
- Almeida, J., D'Amico, E., Preuss, A., Carbone, F., Vos, C. H. R. de, Deiml, B., ... Rosati, C. (2007). Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(1), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.040>
- An, X.-H., Tian, Y., Chen, K.-Q., Liu, X.-J., Liu, D.-D., Xie, X.-B., ... Hao, Y.-J. (2015). MdMYB9 and MdMYB11 are involved in the regulation of the JA-induced biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apples. *Plant & Cell Physiology*, 56(4), 650-662. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu205>

- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., & Lepiniec, L. (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *39*(3), 366-380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x>
- Bianco, L., Lopez, L., Scalone, A. G., Di Carli, M., Desiderio, A., Benvenuto, E., & Perrotta, G. (2009). Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *Journal of Proteomics*, *72*(4), 586-607. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.11.019>
- Bombarely, A., Merchante, C., Csukasi, F., Cruz-Rus, E., Caballero, J. L., Medina-Escobar, N., ... Valpuesta, V. (2010). Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. *BMC Genomics*, *11*, 503. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-503>
- Böttcher, C., Burbidge, C. A., di Rienzo, V., Boss, P. K., & Davies, C. (2015). Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(7), 618-627. <https://doi.org/10.1111/jipb.12321>
- Buendía, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., ... Tomás-Barberán, F. A. (2010). HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 3916-3926. <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
- Carbone, F., Preuss, A., De Vos, R. C. H., D'Amico, E., Perrotta, G., Bovy, A. G., ... Rosati, C. (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment*, *32*(8), 1117-1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01994.x>
- Çevik, V., Kidd, B. N., Zhang, P., Hill, C., Kiddle, S., Denby, K. J., ... Kazan, K. (2012). MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *160*(1), 541-555. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202697>
- Chai, Y.-M., Jia, H.-F., Li, C.-L., Dong, Q.-H., & Shen, Y.-Y. (2011). FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, *62*(14), 5079-5089. <https://doi.org/10.1093/jxb/err207>
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., ... Li, C. (2012). The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid

- signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant Cell*, 24(7), 2898-2916. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098277>
- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. (2014). «Movers and shakers» in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4705-4722. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru280>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Ben-Romdhane, W., Hassairi, A., & Aboul-Soud, M. A. M. (2017). Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PLOS ONE*, 12(6), e0177381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177381>
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., & Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 59(1), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03852.x>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 70, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J. R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M., ... Medina-Escobar, N. (2011). Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *The New Phytologist*, 191(2), 376-390. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03700.x>
- Davies, C., Boss, P. K., & Robinson, S. P. (1997). Treatment of Grape Berries, a Nonclimacteric Fruit with a Synthetic Auxin, Retards Ripening and Alters the Expression of Developmentally Regulated Genes. *Plant Physiology*, 115(3), 1155-1161.
- de Ollas, C., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of Arabidopsis under water stress

- conditions. *Plant, Cell & Environment*, 38(10), 2157-2170. <https://doi.org/10.1111/pce.12536>
- Dixon, R. A., Liu, C., & Jun, J. H. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.07.004>
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2225-2245. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048017>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573-581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Eshghi, S., & Tafazoli, E. (2007). Possible Role of Cytokinins in Flower Induction in Strawberry - SciAlert Responsive Version. *American Journal of Plant Physiology*, 167-174. <https://doi.org/10.3923/ajpp.2007.167.174>
- Fan, X., Mattheis, J. P., & Fellman, J. K. (1998). A role for jasmonates in climacteric fruit ripening. *Planta*, 204(4), 444-449. <https://doi.org/10.1007/s004250050278>
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701-715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Figueroa, P., & Browse, J. (2012). The Arabidopsis JAZ2 promoter contains a G-Box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins. *Plant & Cell Physiology*, 53(2), 330-343. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr178>
- Figueroa, P., & Browse, J. (2015). Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 81(6), 849-860. <https://doi.org/10.1111/tpj.12776>
- Folta, K. M., & Davis, T. M. (2006). Strawberry Genes and Genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), 399-415. <https://doi.org/10.1080/07352680600824831>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>

- Fonseca, S., Fernández-Calvo, P., Fernández, G. M., Díez-Díaz, M., Gimenez-Ibanez, S., López-Vidriero, I., ... Solano, R. (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 Are New Targets of JAZ Repressors Negatively Regulating JA Responses. *PLOS ONE*, 9(1), e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). *FAOSTAT statistics database*. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9608940>
- Gharras, H. E. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2512-2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Given, N. K., Venis, M. A., & Gierson, D. (1988). Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, 174(3), 402-406. <https://doi.org/10.1007/BF00959527>
- Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., & Napier, R. (2017). Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1333-1347. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw440>
- Goossens, J., Swinnen, G., Vanden Bossche, R., Pauwels, L., & Goossens, A. (2015). Change of a conserved amino acid in the MYC2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity. *The New Phytologist*, 206(4), 1229-1237. <https://doi.org/10.1111/nph.13398>
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G., & Goossens, A. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Reports*, 10(8), 923-928. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.103>
- Han, G.-Z. (2017). Evolution of jasmonate biosynthesis and signaling mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1323-1331. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw470>
- Hannum, S. (2004). Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408690490263756>
- Hollender, C. A., Kang, C., Darwish, O., Geretz, A., Matthews, B. F., Slovin, J., ... Liu, Z. (2014). Floral Transcriptomes in Woodland Strawberry Uncover Developing

- Receptacle and Anther Gene Networks. *Plant Physiology*, 165(3), 1062-1075. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237529>
- Huang, Z., Jin, S.-H., Guo, H.-D., Zhong, X.-J., He, J., Li, X., ... Chen, Q.-B. (2016). Genome-wide identification and characterization of TIFY family genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses. *PeerJ*, 4, e2620. <https://doi.org/10.7717/peerj.2620>
- Iannetta, P. P. M., Laarhoven, L.-J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. V., & Harren, F. J. M. (2005). Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, 127(2), 247-259. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00656.x>
- Itzhaki, Z., Akiva, E., Altuvia, Y., & Margalit, H. (2006). Evolutionary conservation of domain-domain interactions. *Genome Biology*, 7(12), R125. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-12-r125>
- Jaakola, L. (2013a). Phenylpropanoid Metabolism and Biosynthesis of Anthocyanins. En *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening* (pp. 117-134).
- Jaakola, L. (2013b). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 18(9), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>
- Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., ... Fang, J. (2016). Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnology Journal*, 14(10), 2045-2065. <https://doi.org/10.1111/pbi.12563>
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>
- Jia, H.-F., Lu, D., Sun, J.-H., Li, C.-L., Xing, Y., Qin, L., & Shen, Y.-Y. (2013). Type 2C protein phosphatase ABI1 is a negative regulator of strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1677-1687. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert028>
- Jiang, Y., & Joyce, D. C. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 171-174. <https://doi.org/10.1023/A:1022539901044>

- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111732>
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular Plant*, 6(3), 686-703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>
- Koo, A. J. K., Cooke, T. F., & Howe, G. A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9298-9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103542108>
- Koo, Y. J., Yoon, E. S., Seo, J. S., Kim, J.-K., & Choi, Y. D. (2013). Characterization of a methyl jasmonate specific esterase in arabidopsis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(1), 27-33. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2201-7>
- Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4561-4575. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru277>
- Li, Q., Zheng, J., Li, S., Huang, G., Skilling, S. J., Wang, L., ... Liu, P. (2017). Transporter-Mediated Nuclear Entry of Jasmonoyl-Isoleucine Is Essential for Jasmonate Signaling. *Molecular Plant*, 10(5), 695-708. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.010>
- Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T. K., ... Allan, A. C. (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*, 10, 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-50>
- Lin-Wang, K., McGhie, T. K., Wang, M., Liu, Y., Warren, B., Storey, R., ... Allan, A. C. (2014). Engineering the anthocyanin regulatory complex of strawberry (*Fragaria vesca*). *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00651>
- Liu, B., Poulsen, E. G., Davis, T. M., & Jenkins, G. (2016). Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids. *Genome*, 59(2), 79-86. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0116>
- Long, J. A., Ohno, C., Smith, Z. R., & Meyerowitz, E. M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5779), 1520-1523. <https://doi.org/10.1126/science.1123841>

- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 16(7), 1938-1950. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
- Manning, K. (1993). Soft fruit. En *Biochemistry of Fruit Ripening* (pp. 343-378).
- Martínez, G. A., Chaves, A. R., & Añón, M. C. (1996). Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 15(3), 139. <https://doi.org/10.1007/BF00198929>
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. J., & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00079>
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., Hoffmann, T., Ring, L., Rodríguez-Franco, A., ... Blanco-Portales, R. (2014). MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria x ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 401-417. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert377>
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A. J. K., Moreno, J. E., Suzuki, K., ... Ohme-Takagi, M. (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(5), 1641-1656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., & Lepiniec, L. (2001). The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant Cell*, 13(9), 2099-2114.
- Nesi, Nathalie, Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., & Lepiniec, L. (2000). The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in Arabidopsis Siliques. *The Plant Cell*, 12(10), 1863-1878. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.10.1863>
- Nitsch, J. P. (1950). Growth and Morphogenesis of the Strawberry as Related to Auxin. *American Journal of Botany*, 37(3), 211-215. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1950.tb12183.x>

- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. (2014). El mercado de las frutillas. Recuperado de <https://www.odepa.gob.cl>
- Ornelas-Paz, J. de J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J. D., Escalante-Minakata, M. del P., Ibarra-Junquera, V., ... Ochoa-Reyes, E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, *138*(1), 372-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.006>
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, *23*(9), 3089-3100. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089300>
- Pérez, A. C., & Goossens, A. (2013). Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant, Cell & Environment*, *36*(12), 2071-2084. <https://doi.org/10.1111/pce.12121>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9703563>
- Perkins-Veazie, P. (1996). Growth and Ripening of Strawberry Fruit. En *Horticultural Reviews* (pp. 267-290).
- Petroni, K., & Tonelli, C. (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, *181*(3), 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009>
- Pires, N., & Dolan, L. (2010). Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop-Helix Proteins in Plants. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(4), 862-874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>
- Qi, T., Huang, H., Song, S., & Xie, D. (2015). Regulation of Jasmonate-Mediated Stamen Development and Seed Production by a bHLH-MYB Complex in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *27*(6), 1620-1633. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00116>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., ... 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>

- Salvatierra, A., Pimentel, P., Moya-León, M. A., & Herrera, R. (2013). Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry*, *90*, 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.016>
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., ... Shirasu, K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *163*(1), 291-304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
- Schaart, J. G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., van Houwelingen, A. M. M. L., de Vos, R. C. H., Jonker, H. H., ... Bovy, A. G. (2013). Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *The New Phytologist*, *197*(2), 454-467. <https://doi.org/10.1111/nph.12017>
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., ... Choi, Y. D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(8), 4788-4793. <https://doi.org/10.1073/pnas.081557298>
- Shan, X., Yan, J., & Xie, D. (2012). Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.09.006>
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., ... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, *468*(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., ... Foltá, K. M. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, *43*(2), 109-116. <https://doi.org/10.1038/ng.740>
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C. L., Cooke, T. F., Sheard, L. B., Moreno, J. E., ... Howe, G. A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates

- transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 536-550. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093005>
- Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid Metabolism in Ripening Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), 398-416. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00116.x>
- Smith, R., & Skog, L. (2003). Strawberries. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 5624-5628).
- Song, S., Qi, T., Fan, M., Zhang, X., Gao, H., Huang, H., ... Xie, D. (2013). The bHLH Subgroup IIIId Factors Negatively Regulate Jasmonate-Mediated Plant Defense and Development. *PLOS Genet*, 9(7), e1003653. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003653>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The Oxylipin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Sun, J.-H., Luo, J.-J., Tian, L., Li, C.-L., Xing, Y., & Shen, Y.-Y. (2013). New Evidence for the Role of Ethylene in Strawberry Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(3), 461-470. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9312-6>
- Symons, G. M., Chua, Y.-J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., & Reid, J. B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers147>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 82(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/tpj.12841>
- Toljamo, A., Blande, D., Kärenlampi, S., & Kokko, H. (2016). Reprogramming of Strawberry (*Fragaria vesca*) Root Transcriptome in Response to Phytophthora cactorum. *PloS One*, 11(8), e0161078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161078>
- Trainotti, L., Pavanello, A., & Casadoro, G. (2005). Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2037-2046. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri202>

- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science*, 12(6), 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.004>
- Villarreal, N. M., Bustamante, C. A., Civello, P. M., & Martínez, G. A. (2010). Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 683-689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3868>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Walker, A. R., Davison, P. A., Bolognesi-Winfield, A. C., James, C. M., Srinivasan, N., Blundell, T. L., ... Gray, J. C. (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 11(7), 1337-1350.
- Wang, Q.-H., Zhao, C., Zhang, M., Li, Y.-Z., Shen, Y.-Y., & Guo, J.-X. (2017). Transcriptome analysis around the onset of strawberry fruit ripening uncovers an important role of oxidative phosphorylation in ripening. *Scientific Reports*, 41477. <https://doi.org/10.1038/srep41477>
- 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, C. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development — Applied aspects. *Biotechnology Advances*, 32(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.009>
- Wasternack, C., & Feussner, I. (2018). The Oxylin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), null. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040440>
- Wasternack, C., & Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, 5(1), 63-77. <https://doi.org/10.1021/cb900269u>
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303-1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>

- Wasternack, C., & Strnad, M. (2017). Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites — Pathways, transcription factors and applied aspects — A brief review. *New Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.007>
- Wasternack, C., & Strnad, M. (2018). Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2539. <https://doi.org/10.3390/ijms19092539>
- Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., ... Heitz, T. (2013). The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 Contribute to Jasmonoyl-Isoleucine Hormone Turnover and Generate 12-Hydroxyjasmonic Acid Upon Wounding in Arabidopsis Leaves. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(44), 31701-31714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499228>
- Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T., & Galis, I. (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *72*(5), 758-767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05117.x>
- Xiang, Y., Huang, C.-H., Hu, Y., Wen, J., Li, S., Yi, T., ... Ma, H. (2017). Evolution of Rosaceae Fruit Types Based on Nuclear Phylogeny in the Context of Geological Times and Genome Duplication. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(2), 262-281. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw242>
- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, *280*(5366), 1091-1094.
- Ye, H., Du, H., Tang, N., Li, X., & Xiong, L. (2009). Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. *Plant Molecular Biology*, *71*(3), 291-305. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9524-8>
- Yuan, Z., & Zhang, D. (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Current Opinion in Plant Biology*, *27*, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.024>
- Zhang, F., Yao, J., Ke, J., Zhang, L., Lam, V. Q., Xin, X.-F., ... He, S. Y. (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signaling. *Nature*, *525*(7568), 269-273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>
- Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X., & Fang, C. (2011). Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) during fruit development and

- maturation. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1103-1118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq343>
- Zhang, Y., Gao, M., Singer, S. D., Fei, Z., Wang, H., & Wang, X. (2012). Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. *PloS One*, 7(9), e44465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044465>
- Zhao, F., Li, G., Hu, P., Zhao, X., Li, L., Wei, W., ... Zhou, H. (2018). Identification of basic/helix-loop-helix transcription factors reveals candidate genes involved in anthocyanin biosynthesis from the strawberry white-flesh mutant. *Scientific Reports*, 8(1), 2721. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21136-z>
- Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., ... Dong, X. (2012). Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587-596. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>

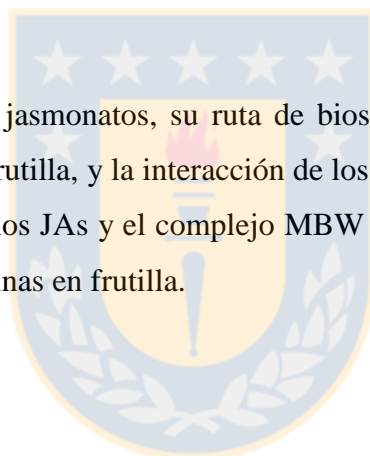


Hipótesis.

1. La concentración de jasmonatos disminuye durante el desarrollo y maduración de los frutos de *Fragaria × ananassa* Duch., concomitante a una disminución en la expresión relativa de los genes relacionados a la vía de biosíntesis y de señalización de los jasmonatos, entre estos los genes *JAZ* y *MYC2*.
2. Los represores transcripcionales *JAZ* de frutilla interaccionan con las proteínas de la vía de señalización de los JAs, así como con los factores de transcripción del complejo MBW de frutilla, sugiriendo una conexión entre la vía de señalización molecular de los jasmonatos y la biosíntesis de proantocianidinas y antocianinas en frutilla.

Objetivo general.

Elucidar la dinámica de los jasmonatos, su ruta de biosíntesis y señalización durante el desarrollo y maduración de frutilla, y la interacción de los represores *JAZ* con las proteínas de la vía de señalización de los JAs y el complejo MBW relacionado con la biosíntesis de proantocianidinas y antocianinas en frutilla.



Objetivos específicos.

1. Determinar los niveles endógenos de los principales jasmonatos (OPDA, JA, MeJA y JA-Ile) y los perfiles de expresión génica de genes del metabolismo, durante el desarrollo y la maduración de frutos de *Fragaria × ananassa* Duch.
2. Identificar los componentes de la vía de señalización de los JAs en *Fragaria vesca* L. a nivel molecular, y caracterizar la expresión génica relacionada en frutos de *Fragaria × ananassa* Duch.
3. Evaluar las interacciones de las proteínas *JAZ* con el co-receptor COI1 de la vía de señalización de JAs, mediado por coronatina, en *Fragaria × ananassa* Duch.
4. Evaluar las interacciones de las proteínas *JAZ* con los reguladores positivos y negativos de la vía de señalización de JAs, y con los factores de transcripción del complejo MBW de biosíntesis de proantocianidinas y antocianinas en *Fragaria × ananassa* Duch.

Capítulo 2:

Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening

Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P.M. & Figueroa, C.R. (2018). Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 37: 101-113. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9710-x>

2.1. Abstract.

The plant hormone jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) is involved in stress response, development, and secondary metabolite production, although its role in fruit development and ripening remains unknown. The aim of this study is to describe variations of endogenous jasmonate (JAs) contents and JA metabolism-related genes in order to associate these to the evolution of abscisic acid (ABA) content during development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Aromas) fruit. A quantitative analysis of phytohormones and gene expression was carried out using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) assays, respectively. The expression of genes encoding for JA metabolism enzymes exhibited a significant decrease concomitant to reduction of JAs and an increment of ABA levels from flowering to ripening stages. Exogenous application of methyl jasmonate (MeJA) triggered anthocyanin accumulation along with an increase in JA-Ile, JA, and MeJA levels, and a concomitant decrease in ABA. Together, these results provide insights into JAs homeostasis during strawberry fruit development, suggesting that MeJA-induced anthocyanin accumulation could be mediated by the activation of the JA signaling pathway. Furthermore, we propose an antagonistic relationship from the JA to the ABA pathway during non-climacteric strawberry fruit development and ripening.

Keywords: Abscisic acid (ABA), Anthocyanins, *Fragaria × ananassa*, Fruit development and ripening, Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), Oxylipins.

2.2. Introduction.

Fruits, during the course of their development from ovary to maturity, experience a wide range of molecular and physiological changes, where ripening-related changes associated with color, fruit softening, increase in specific volatiles, and alterations in the sugar/acid balance can be observed (Cherian et al., 2014). In addition, fruit development and ripening is regulated by several phytohormones, although ethylene and abscisic acid (ABA) have been described as the main regulators of ripening in climacteric tomato fruit and in non-climacteric strawberry fruit, respectively (Cherian et al., 2014; Jia et al., 2011; Symons et al., 2012). Exogenous ABA activates the phenylpropanoid pathway and increases anthocyanin content in strawberry fruit (Jiang & Joyce, 2003). This was confirmed by Jia et al. (2011) by showing that an increase of endogenous ABA during fruit development and ripening promotes the red coloration of strawberry fruits by an increase in anthocyanin content. Furthermore, the RNAi-mediated downregulation in fruit of *FaNCED1* (9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase), a regulatory ABA biosynthesis gene, resulted in decreased red coloration and anthocyanin content (Jia et al., 2011).

The dynamics and role of other hormones like auxin, brassinosteroids, and gibberellins during the initial stages of strawberry fruit development have also been described (Symons et al., 2012). Nevertheless, the role of jasmonates (JAs) during this developmental process has not been completely understood because the dynamics of the bioactive jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) during strawberry fruit development remains unknown. Methyl jasmonate (MeJA) levels decrease from immature-to-ripe strawberry fruit (Gansser, Latza, & Berger, 1997) just like JA and JA-Ile levels during development and ripening of grape, another nonclimacteric fruit (Böttcher et al., 2015). The effects of exogenous MeJA application on plants are better known, for instance, MeJA treatment has helped to reveal the molecular basis for JA-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings (Shan et al., 2009). In the case of Chilean strawberry [*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.] fruit, MeJA application at the green-white stage induces an increase in red coloration of fruit skin and an increase in anthocyanin levels with the concomitant upregulation of the phenylpropanoid pathway and JAs biosynthesis-related genes (Concha et al., 2013).

JAs are oxylipins the biosynthesis of which begins in the plastids, where α -linolenic acid fatty acid is transformed into several intermediates by reactions catalyzed by 13-lipoxygenase (13-LOX) and allene oxide synthase (AOS), leading to 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA). Next, OPDA is translocated to the peroxisome where 12-oxophytodienoate

reductase 3 (OPR3) and several β -oxidation cycles give rise to jasmonic acid (JA; Wasternack & Kombrink, 2010). The biosynthesis of MeJA and JA-Ile from JA are catalyzed by jasmonic acid methyltransferase (JMT; Seo et al., 2001) and jasmonic acid-amide synthetase 1 (JAR1; Staswick & Tiryaki, 2004), respectively. The reconversion of MeJA and JA-Ile to JA are catalyzed by methyl jasmonate esterase (MJE; Koo et al., 2013) and JA-Ile hydrolase 1 (JIH1; Woldemariam et al., 2012), respectively (Fig. 2.1). Regarding JA biosynthesis and in an accordant trend with MeJA levels during strawberry fruit development (Gansser et al., 1997), the expressions of JA biosynthesis genes *13-LOX*, *AOS*, *OPR3*, and *JMT* have been reported to decrease as strawberry fruit develops and ripens (Preuß et al., 2014). In the case of grape berry fruit, the high endogenous levels of JA and JA-Ile at early developmental fruit stages could promote cell division and fruit set (Böttcher et al., 2015).

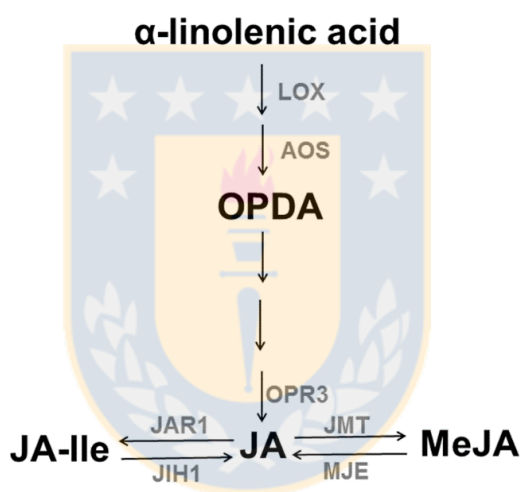


Fig. 2.1. Oxylipin metabolism pathway adapted from (Meesters et al., 2014). 13-LOX 13-lipoxygenase, AOS allene oxide synthase, JA jasmonic acid, JA-Ile jasmonoyl-isoleucine, JAR1 jasmonic acidamide synthetase 1, JIH1 jasmonoyl isoleucine hydrolase 1, JMT jasmonic acid methyltransferase, MeJA methyl jasmonate, MJE methyl jasmonate esterase, OPDA 10-oxophytodienoic acid, OPR3 12-oxophytodienoate reductase 3.

Elucidating the dynamics of phytohormone accumulation is essential for understanding fruit biology, regulation of the ripening process, and determination of fruit-quality characteristics, especially for non-climacteric fruits where the roles of each phytohormone and their crosstalks are still unclear. In this sense, this research aims to elucidate the basis of JAs putative accumulation during strawberry fruit development and

ripening and its relationship with ABA, the main phytohormone involved in the regulation of strawberry fruit ripening. In this sense, we described novel information about JAs dynamics during fruit development and ripening of strawberry (*F. × ananassa* cv. Aromas), characterizing the developmental associated JAs (that is OPDA, JA and JA-Ile) for the first time in strawberry fruit, along with ABA accumulation. Then, we analyzed the transcriptional pattern of *JAR1*, the key gene encoding for the JA-Ile synthesis enzyme, and the JA turnover-related genes (that is *MJE* and *JH1*). Because not much is known about the relationships between the different hormones involved in development and ripening of strawberry fruit, we studied the effects of over accumulations of JAs on ABA levels by performing exogenous application of MeJA to developing fruits. We noted at the same developmental stage that while the anthocyanin levels rose, ABA levels fell, meaning a possible negative role of JA-Ile accumulation on ABA biosynthesis. Our results provide new information about JAs dynamics during strawberry fruit development and ripening and suggest that JA pathway activation could behave as a negative regulator of ABA biosynthesis in strawberry fruit.

2.3. Material and methods.

2.3.1. Plant Material.

Strawberry (*F. × ananassa* cv. Aromas) flowers and fruits at different developmental stages were collected from plants grown in a commercial field at Angol, Araucanía Region, Chile (latitude 37°45'18"S; longitude 72°36'49"W). Plant material was collected on March 27, April 8, and April 24, 2014 corresponding to the first, the second, and the third harvests, respectively. The picked flowers (flowering stage, F) and fruits were transported to the laboratory under refrigerated conditions and classified in six developmental stages according to changes in color and receptacle size: small green (SG), large green (LG); white (W); turning (T; up to 25% red receptacle); 50% red receptacle (50%R), and 100% red receptacle (R) corresponding to 10, 17, 20, 21, 23, and 25 days after anthesis (DAA), respectively (Fig. S2.1). Fruit of each developmental stage was characterized by fruit-quality parameters [that is weight, firmness, soluble solids content (SSC)/titratable acidity (TA) ratio, and color] along with phytohormone content and relative levels of gene expression.

2.3.2. Fruit-Quality Assessments.

Thirty fruits for each developmental stage and harvest date were weighed, and color and firmness were estimated. The surface color was characterized using a colorimeter (model CR-400, Konica Minolta, Tokyo, Japan) and expressed as CIE L^* a^* b^* coordinates along with the dimensions of color chroma and hue angle (h°). L^* indicates lightness, a^* indicates chromaticity on a green (–) to red (+) axis, and b^* chromaticity on a blue (–) to yellow (+) axis. Numerical values of a^* and b^* were transformed into chroma [$\text{chroma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] and hue angle [$h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$] as previously reported (McGuire, 1992). Firmness was determined using a texture analyzer (model CT3, Brookfield, MA, USA), and the results were expressed in Newton units (N). For color and firmness determination, two measurements on each equatorial side for each fruit were performed. After these analyses, the fruits were cut into pieces, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further use. For determination of SSC and TA, 1 g of frozen tissue for each stage was grounded with liquid nitrogen, homogenized in 5 mL of distilled water, and filtered through Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany). SSC was determined in the juice at 20°C using a hand-held temperature-compensated refractometer (Atago, Tokyo, Japan). TA was determined by diluting the remaining juice in distilled water (1/10, v/v) and titrating a 13-mL aliquot to pH 8.2 using 20 mN NaOH. The results were expressed as the SSC/TA ratio. For each parameter, the mean values of the three harvest values are shown (Table S2.1).

2.3.3. Quantification of Phytohormone Levels Using LC-MS/MS

The levels of JA, JA-Ile, OPDA, MeJA, salicylic acid (SA), and ABA in flowering and fruit developmental stages, and MeJA-treated fruits were quantified by the Proteomics and Mass Spectrometry facility at the Danforth Plant Science Center (St. Louis, MO, USA) by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Lyophilized plant samples (150 mg) were grounded with a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) for 5 min at 20 Hz s^{-1} . Hormones were extracted in ice-cold methanol/acetonitrile (MeOH/ACN, 1/1, v/v) from samples spiked with deuterium-labeled internal standards for SA (D4-SA), ABA (D6-ABA), and JA (D2-JA). D2-JA was the standard used to quantify OPDA, JA, MeJA, and JA-Ile levels as previously reported (Pan et al., 2010). After centrifugation at 16,000 rpm, the supernatants were collected and pellet extraction repeated. The pooled supernatants were evaporated and the resulting pellet dissolved in 200 μL of 30% (v/v) MeOH.

Chromatographic separation of metabolites was accomplished with Ekspert microLC 200 system (AB Sciex, Framingham, MA, USA) using Acquity UPLC BEH C18 column (130 Å, 1.7 µm, 1.0 × 100 mm) and a gradient of 80% solvent A [0.1% (v/v) formic acid in HPLC-grade water] to 70% solvent B [0.1% (v/v) formic acid in 100% ACN] for 3 min and then ramped up to 95% solvent B for 0.5 min at a flow rate of 20 µL min⁻¹. A 6500-QTRAP (AB Sciex) was used to acquire MS spectra. Parameters for analysis were set for all the compounds, except MeJA as follows: ESI in negative mode, capillary voltage -4500, nebulizer gas 35 arbitrary units (a.u.), heater gas 35 a.u., curtain gas 15 a.u., collision activation dissociation medium, and temperature 350 °C. For ionization of MeJA, the ESI was set in positive mode and the capillary voltage at +5500. Compounds were detected using multiple reaction-monitoring (MRM) transitions that were optimized for each phytohormone and deuterium-labeled standard (Table S2.2). Hormone levels were determined from the standard curves of known phytohormone concentrations and expressed as nanomoles per gram of fresh weight (FW).

2.3.4. Gene Expression Analysis.

Total RNA was extracted from 4 g of flowers and fruits by the CTAB method (Liao et al., 2004) with modifications and purified using RNA mini-columns (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Germany). All RNA samples were quantified by fluorescence (Qubit, ThermoFisher Scientific, USA), and integrity was confirmed on agarose gels. cDNA was obtained using 1 µg of total RNA according to the manufacturer's instructions (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Finland), confirmed by amplification of control gene FaTIFY8 (Preuß et al., 2014) and visualized on agarose gel. Expression analysis of genes related to *F. × ananassa* JA metabolism and ABA biosynthesis was done by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) in a Real-Time PCR System (PikoReal, Thermo Scientific, Finland). Protein sequences of *A. thaliana* JAR1 (AtJAR1), *Nicotiana attenuata* Steud. JIH1 (NaJIH1), and MJE (NaMJE) were used to search orthologous genes in *Fragaria vesca* L. transcriptome (Refseq transcripts, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) by means of tblastn search tool (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences with higher coverage and identity, and with lower e-values, were selected for primer design of each gene (Table S2.3) using full-length cDNA sequences and Primer3 and Primer-BLAST bioinformatics tools. Specific primers for *13-LOX*, *AOS*, *OPR3*, and *JMT* were designed from full-length cDNA sequences of *F. vesca* as previously reported (Concha et al., 2013; Preuß et al., 2014). For NCED1,

specific primers for the *F. × ananassa* encoding sequence were obtained from Jia et al. (2011). All primers sequences used for RT-qPCR are shown in Table S2.4 and generated single PCR products. Amplification reactions were performed in triplicate per sample (biological replicate) using the KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions, and the thermal profile for every gene was 95 °C for 10 min; 95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s (40 cycles); and final melting curve of 60 °C for 30 s, 95 °C for 15 s, and 20 °C for 10 min. Each RT-qPCR reaction was performed in triplicate (technical replicate), and a no-template control (NTC) was included in each run. The relative expression levels for each gene of interest corresponded to the mean of the three biological replicates normalized to the expression of *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* housekeeping gene (Preuß et al., 2014). The three biological replicates corresponded to each harvest date, and the results are expressed as mean of these. Three technical replicates were performed for each sample in different RTqPCR experiments, and control fruits from the white stage were used as the calibrator sample and assigned a nominal value of one. The expression levels were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) and expressed in relative arbitrary units.

2.3.5. MeJA Treatment.

Peduncles of three W-stage fruits were trimmed to a uniform length of 50 mm and immersed in sterile tubes (50 mL) with autoclaved distilled water containing 88 mM sucrose and 1 mM hydroxyquinoline hemisulfate (HQS) plus 100 μ M MeJA according to Concha et al. (2013). The fruits in solution were incubated in a growth chamber under standard fluorescent lights (16-h photoperiod and 40 μ mol m⁻² s⁻¹ light intensity) at 24 °C. Fruit sampling was performed at 5 days of MeJA incubation according to the peak of anthocyanin levels previously observed (Concha et al. 2013). At each treatment and time, three biological replicates were used for the different analyses.

2.3.6. Total Anthocyanin Content.

The total anthocyanin content (TAC) was quantified by the differential pH method according to Lee et al., (2005) with slight modifications. Briefly, 150 mg of fruit were grounded with liquid nitrogen, homogenized with EtOH/1.5 mN HCl (85/15, v/v) and stored in darkness at 4 °C overnight, samples were then centrifuged at 12,000 rpm during 10 min at 4 °C. Absorbance was determined in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 2, Thermo Scientific, Finland) at 520 nm (buffer 25 mM KCl pH 1.0 and buffer 400 mM sodium acetate pH 4.5). Absorbance values were converted to total μ g of pelargonidin 3-glucoside

equivalents per gram of FW using the molar extinction coefficient of 22,400 M⁻¹ cm⁻¹ and the formula: $A = [(A520)_{\text{pH 1.0}} - (A520)_{\text{pH 4.5}}]$.

2.3.7. Statistical Analysis.

The data were analyzed by one-way ANOVA test using SAS software (version 9.0.0; Institute Inc., NC, USA) and the differences were considered statistically significant at p -value ≤ 0.05 (LSD test). The hormone quantification of each sample was conducted separately for each harvest date considering three biological replicates.

2.4. Results.

2.4.1. Reduction of Oxylin Levels During Fruit Development and Ripening.

To study oxylin dynamics from F to R stages we quantified the levels of the oxylin OPDA, JA, MeJA and JA-Ile together with other phytohormones such as ABA and SA in flowers and fruit at different developmental stages during the growing season including the mentioned three harvest dates (Fig. 2.2, Fig. S2.2). Overall, the JAs levels decreased constantly from F to R stages along with an ABA increment observed in the three harvests (Fig. 2.2). Remarkably, all JAs contents showed similar accumulation patterns in each harvest (Fig. 2.2a–f). In the case of JA and JA-Ile, flowers exhibited the highest contents of both JAs and then diminished gradually until 25 DAA (R stage). In the first harvest, JA levels had a transitory maximum at 21 DAA (T stage) (Fig. 2.2a), in the second harvest the JA-Ile level transiently increased at 23 DAA (50%R stage) (Fig. 2.2b), whereas in the third harvest both JAs remained at low levels from 21 to 25 DAA (T to R stages) (Fig. 2.2c). In contrast, MeJA levels were lower than those of JA and JA-Ile. In the first harvest, MeJA peaked at 10 DAA (SG stage), whereas in the second and third harvests, the F stage showed the highest levels and declined sharply to the W and LG stages, respectively, and was not detected at the R stage in all harvests (Fig. 2.2d–f). OPDA levels showed different patterns depending on the harvest date, although it also presented the lowest levels at 23 and 25 DAA (50%R and R stages) (Fig. 2.2d–f). In the first harvest, OPDA content decreased from 0 to 25 DAA (F to R stages) with an increase at 21 DAA (T stage) consistent with the observed JA level at that harvest (Fig. 2.2a, d). In the second and third harvests, OPDA showed the highest levels at 0 and 17 DAA (F and LG stages) (Fig. 2.2e, f). In summary, oxylin levels in agreement with expression of JA biosynthesis-related

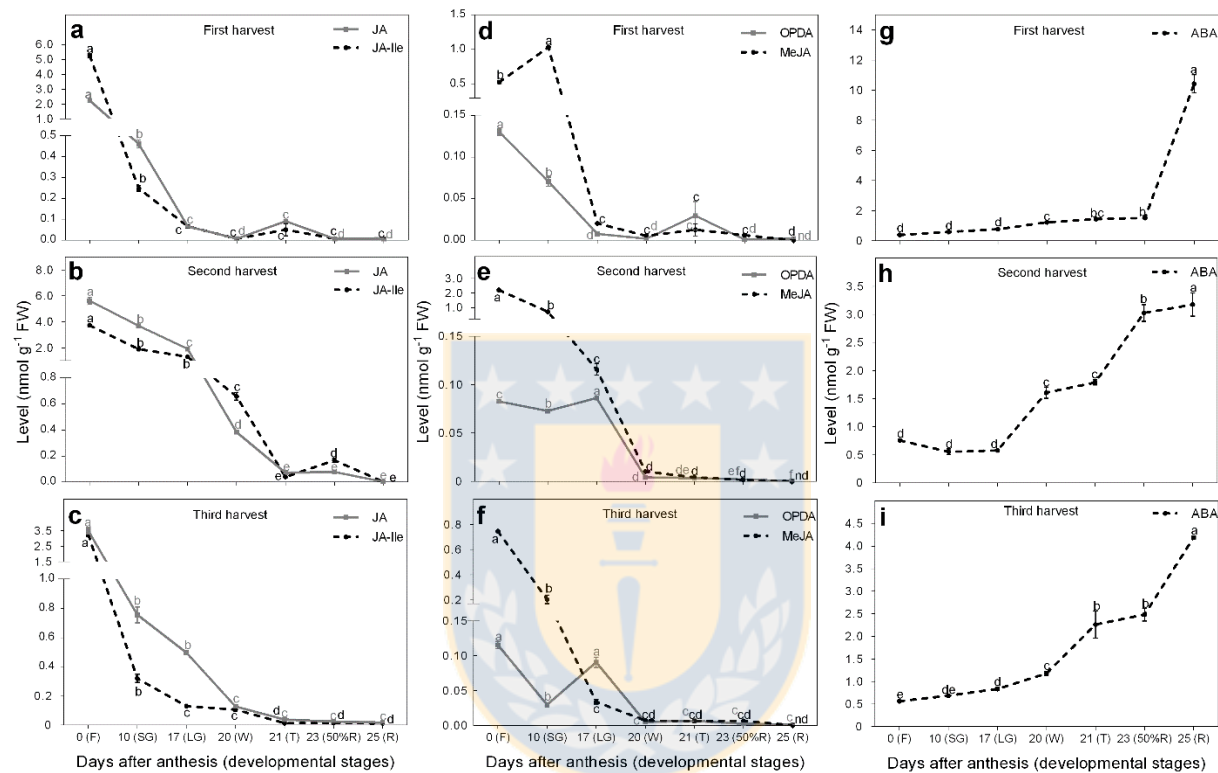


Fig. 2.2. Jasmonic acid (JA), jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), methyl jasmonate (MeJA), oxophytodienoic acid (OPDA), and abscisic acid (ABA) levels from flowering to ripening of strawberry. Changes in JA and JA-Ile (a–c), OPDA and MeJA (d–f), and ABA (g–i) levels (nmol g⁻¹ FW) analyzed during developmental stages of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit of different harvests. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R), and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test, and differences among means \pm SE (n = 3) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$) for each hormone. For experimental details, see the “Materials and Methods” section.

genes were reduced from flowering-to-ripe stages (see next section), suggesting a role of JA-Ile in early stages of fruit development.

ABA is the main regulatory hormone of strawberry fruit ripening. We quantified ABA levels in strawberry fruit to compare JAs' levels during development and ripening. ABA showed an opposite profile to JAs, with low levels from 0 to 17 DAA (F to LG stages), then a constant increase during fruit development and ripening, and then reaching a maximum value at 25 DAA (R stage) in the three harvests (Fig. 2.2g–i). On the other hand, we quantified SA with the aim to corroborate if this hormone presents a particular pattern during fruit development and ripening because there is evidence about the antagonistic role with JA in plant defense (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Although SA levels showed a constant decrease from 0 to 17 DAA (F to LG stages), they exhibited different accumulation profiles among harvests without a clear pattern associated with fruit ripening (Fig. S2.2).

2.4.2. Downregulation of JA Metabolism-Related Genes During Strawberry Fruit Development and Ripening.

To gain insight into JA homeostasis during development and ripening of strawberry fruit cv. Aromas, we first analysed the expression profile of genes encoding for key enzymes involved in JA biosynthesis such as *FaJAR1*, *Fa13-LOX*, *FaAOS*, *FaOPR3* and *FaJMT* (Fig. 2.3a, Fig. S2.3). Flowering and green fruit stages exhibited higher transcript levels of JA biosynthesis-related genes, which decreased during fruit development and ripening (Fig. 2.3a, Fig. S2.3). The expression of *FaAOS* and *FaOPR3* genes showed similar patterns of downregulation during fruit development and ripening, however, *Fa13-LOX* exhibited a different pattern with an expression peak at 20 DAA (W stage) and a significant reduction from 20 to 25 DAA (W to R stages) (Fig. S2.3). *JMT* catalyzes MeJA biosynthesis from JA (Seo et al., 2001) and we observed a steady decrease in *FaJMT* expression between flowering and the large green stage (LG) remaining at low levels during ripening (Fig. S2.3b). Regarding the JA-Ile biosynthesis gene, *JAR1* encodes an enzyme that conjugates JA to Ile (Staswick & Tiriyaki, 2004), and *FaJAR1s* genes showed a downregulation through fruit development (Fig. 2.3a). The expression of *FaJIH1.1* related to the inactivation of JA-Ile, increased from 0 to 10 DAA (F to SG stages), decreased at 17 DAA (LG stage) and then it remained steady until 25 DAA (R stage) (Fig. 2.3b). However, another *FaJIH1* gene, *FaJIH1.2*, exhibited high expression at 0 and 10 DAA (F and SG stages), and then it decreased steadily from 17 to 25 DAA (LG to R stages) (Fig. 2.3b). On the other hand, both *FaMJE1* and *FaMJE2* genes related to the MeJA inactivation, exhibited higher expression

levels at the F and SG stages, and then declined abruptly by 29 and 26-fold as fruit ripens, respectively (Fig. 2.3c). Overall, *FaJIH1s* presented similar expression patterns of downregulation as the other JA biosynthesis genes described before. Taken together, JA biosynthesis- and turnover-related genes followed the same downregulation pattern during development and fruit ripening.

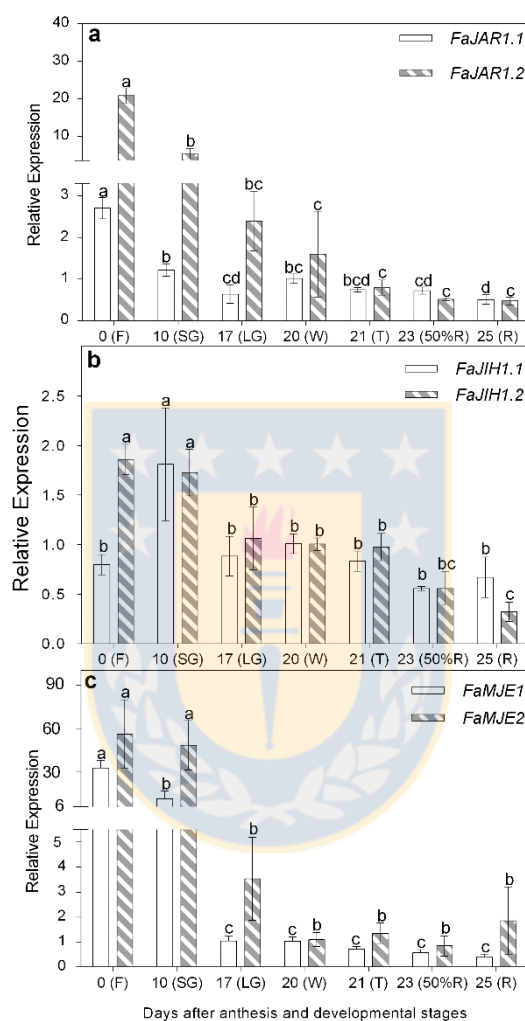


Fig. 2.3. Changes in expression of JA-Ile biosynthesis-related genes and JA turnover-related genes from flowering to ripening of strawberry. Changes in relative expression of *FaJAR1s* (a), *FaJIH1s* (b) and *FaMJE*s (c) genes during developmental stages of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test and differences among means \pm SE ($n = 3$) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between

developmental stages ($p \leq 0.05$) for each gene. For experimental details see the “Materials and Methods” section. JAR1, jasmonic acid-amide synthetase 1, JIH1 jasmonoyl isoleucine hydrolase 1, MJE methyl jasmonate esterase.

2.4.3. Exogenous MeJA Increases JAs and Anthocyanin Content with a Concomitant Reduction of ABA Levels in Fruit.

To study whether exogenous JAs could regulate fruit firmness, color acquisition, and anthocyanin levels, we treated strawberry fruit at the white stage with 100 μM MeJA in an in vitro ripening system. After 5 days of treatment, fruit firmness, color parameters, and total anthocyanin content were quantified (Table 2.1). Firmness values did not show significant differences between control and treated fruits. Secondly, the values of the color parameters such as L^* , b^* and Hue neither exhibited significant differences after MeJA treatment. However, a^* and chroma increased significantly in MeJA-treated fruits compared to controls. These changes were accompanied by a significant increase (2.4-fold, $p \leq 0.05$) in total anthocyanin content expressed as pelargonidin 3-glucoside equivalents. These results corroborate that MeJA treatment triggered color acquisition and anthocyanin accumulation in developing strawberries.

Table 2.1. Changes in firmness (N), color and total anthocyanin content (TAC) after MeJA treatment in strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruits.

Treatment ¹	Firmness (N)	Color parameters					TAC ² ($\mu\text{g g}^{-1}$)
		L^*	a^*	b^*	Chroma	Hue (h°)	
Control	1.55 ± 0.39 a	38.95 ± 6.78 a	20.57 ± 5.93 b	25.19 ± 4.69 a	34.65 ± 1.83 b	45.21 ± 7.62 a	377.72 ± 50.76 b
MeJA	0.98 ± 0.07 a	33.88 ± 1.50 a	32.50 ± 0.72 a	23.36 ± 2.18 a	40.18 ± 0.69 a	35.46 ± 3.06 a	898.83 ± 160.18 a

¹Treatment consisted in the application of 100 μM MeJA or no MeJA (control) to strawberry fruits at white stage (W) during 5 days. See Materials and methods section for details.

²TAC were quantified as total μg of pelargonidin 3-glucoside equivalents per gram of fresh weight.

Data show mean values ± SE (n=3 of three different harvests). For each parameter, different letters indicate significant differences between treatments (LSD test, $p \leq 0.05$).

To explore the effects of exogenous JAs on the dynamics of JAs levels, we quantified JAs and the expression of related genes at 5 days of MeJA treatment. OPDA content showed

an increase although no significant differences were observed between control and MeJA-treated fruits (Fig. 2.4a), along without differences in the expression of *Fal3-LOX* and *FaAOS* JA biosynthesis-related genes (Fig. 2.4e). JA showed the highest rise (25-fold) after MeJA application (Fig. 2.4b) compared to control fruits, although no significant differences in gene expression values between control and treated fruits were observed for *FaOPR3* (Fig. 2.4f) that encodes the enzyme necessary for JA biosynthesis (Claus Wasternack & Kombrink, 2010). MeJA content increased by threefold after MeJA treatment compared to control fruits (Fig. 2.4c) with a concomitant significant fivefold increase of the biosynthetic gene *FaJMT* in fruits treated with MeJA (Fig. 2.4g). Regarding MeJA inactivation genes, *FaMJE1* and *FaMJE2*, only *FaMJE1* exhibited a significant increase in relative expression after MeJA application. The bioactive jasmonate, JA-Ile, showed a significant 4.5-fold increased ($p \leq 0.05$) in fruits treated with MeJA compared to controls (Fig. 2.4d). Biosynthesis and inactivation genes of JA-Ile, *FaJAR1s* and *FaJIH1s*, respectively, did not show differences between control and MeJA-treated fruits with the exception of *FaJAR1.1* expression, which was downregulated during MeJA treatment (Fig. 2.3h). Remarkably, we observed a significant reduction by 1.5-fold ($p \leq 0.05$) in ABA content in MeJA-treated fruits (Fig. 2.5a). This reduction in ABA levels was accompanied also with a significant 1.9-fold ($p \leq 0.05$) decrease in transcript accumulation of the key ABA biosynthetic gene *FaNCE1* (Fig. 2.5b). JA-Ile accumulation and decreasing of ABA levels accompanied by downregulation of *FaNCE1* after MeJA treatment suggest a negative relationship between the JAs and ABA pathways.

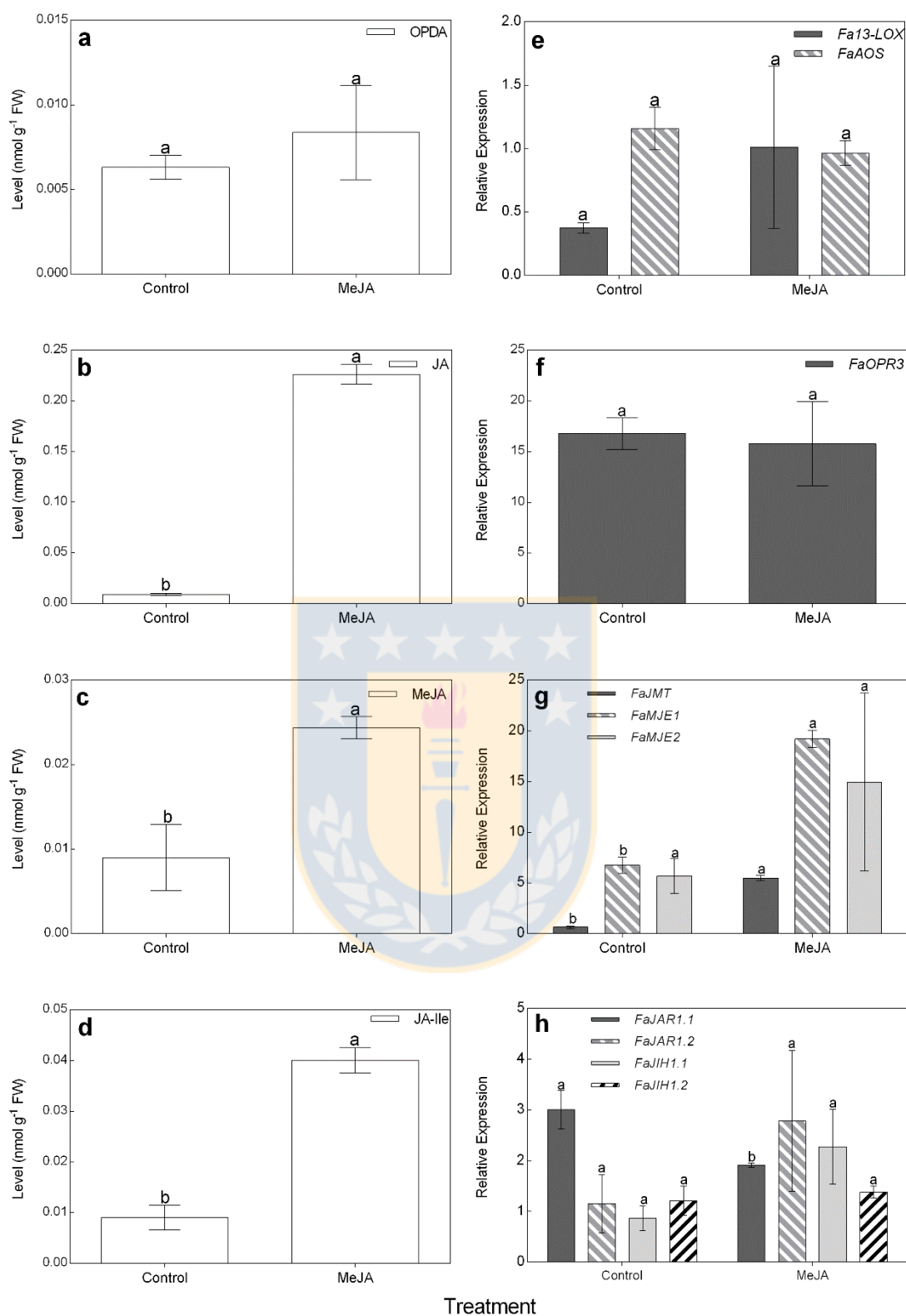


Fig. 2.4. JA, JA-Ile, MeJA, OPDA levels and expression of JAS metabolism-related genes in strawberry fruit after MeJA treatment. Changes in OPDA (a), JA (b), MeJA (c) and JA-Ile (d) levels (nmol g⁻¹ FW) and changes in relative expression of *Fa13-LOX*, *FaAOS* (e), *FaOPR3* (f), *FaJMT*, *FaMJE*s (g) and *FaJAR1*s, *FaJIH1*s (h) in strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit under 100 μM MeJA treatment during 5 days. Data

were analyzed by oneway ANOVA test and differences among means \pm SE ($n = 3$) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$) for each hormone or gene. For experimental details see the “Materials and Methods” section. JA jasmonic acid, JA-Ile jasmonoyl-isoleucine, MeJA methyl jasmonate, OPDA oxophytodienoic acid, 13-LOX 13-lipoxygenase, AOS allene oxide synthase, JAR1 jasmonic acid-amide synthetase 1, JIH1 jasmonoyl isoleucine hydrolase 1, JMT jasmonic acid methyltransferase, MJE methyl jasmonate esterase, OPR3 12-oxophytodienoate reductase 3.

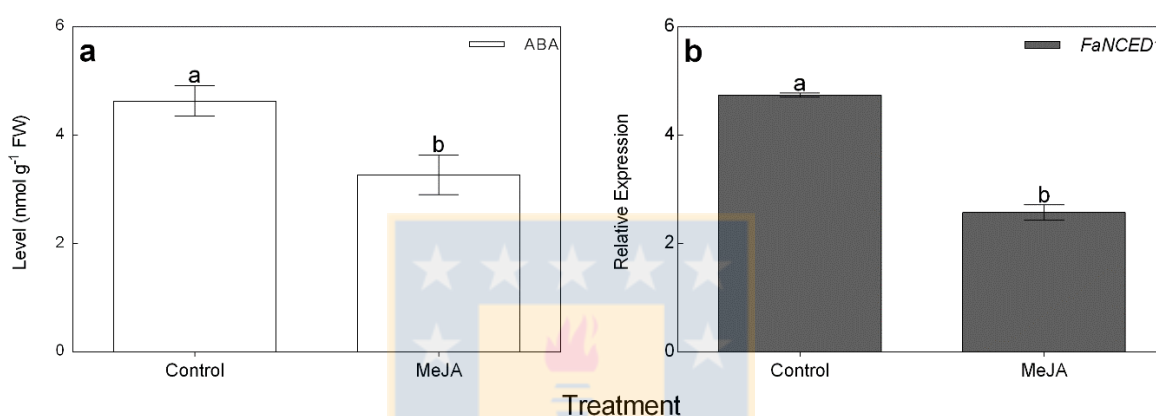


Fig. 2.5. ABA levels and expression of *FaNCED1* in strawberry fruit after MeJA treatment. Changes in ABA (a) level (nmol g⁻¹ FW) and changes in relative expression of *FaNCED1* (b) in strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit under 100 μ M MeJA treatment during 5 days. Data were analyzed by one-way ANOVA test and differences among means \pm SE ($n = 3$) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$) for each hormone or gene. For experimental details see the “Materials and Methods” section. ABA abscisic acid, *FaNCED1* *Fragaria × ananassa* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase 1.

2.5. Discussion.

Plant hormones play an important role in regulating fruit development and ripening (Cherian et al., 2014). In strawberry fruit, several hormones have been studied at the level of biosynthesis, perception, signaling and response (Jia et al., 2011; Symons et al., 2012). Despite progress, challenges remain in understanding the role of JAs in strawberry fruit development. In this work, we observed a coordinated downregulation of the JAs endogenous levels, including bioactive JA-Ile, from flowering to ripening stages. Moreover,

we observed that the accumulation profiles of the JAs and ABA during fruit development are contrasting, ABA being the main hormone that positively regulates strawberry fruit ripening (Jia et al., 2011; Symons et al., 2012). In general, oxylipin levels decreased whereas ABA levels increased from flowering to ripening stages. Although this trend is similar for all hormone level patterns between the three harvests, we observed some point variations in hormone levels at the same developmental stages among different harvests (Fig. 2.2). Particularly, a significant increase of MeJA level was observed in the first harvest at 10 DAA (SG stage), which was not observed in the second and third harvests, where a reduction occurs (Fig. 2.2d–f). This rise was observed over a short period of time, and then a dramatic reduction to 17 DAA (LG stage) was observed, showing from then on a similar pattern to the other harvests. On the other hand, ABA content increased markedly by 10-folds in the first harvest between 23 and 25 DAA (50%R and R stages), whereas in other harvests a slight and constant increase from 17 to 25 DAA (LG to R stages) was observed (Fig. 2.2g–i). Biotic and abiotic stresses associated to field conditions to which strawberry plants of the different harvests have been exposed, could be trigger factors for both MeJA and ABA rough accumulations because these environmental signals have been described as inductors for the activation of JAs and ABA responses (Wasternack, 2007, Sah et al., 2016;).

2.5.1. Coordinated Downregulation of JA-Ile Levels and FaJAR1s and FaJIH1.2 Expressions During Strawberry Fruit Development and Ripening.

Like other phytohormones, JAs homeostasis maintenance is controlled by metabolism (biosynthesis, conjugation, and degradation), signaling and transport (Rosquete et al., 2012). In the present research, we reported high relative levels of JA-Ile in strawberry flowers, and then a coordinated decrease as the fruit develops and ripens (Fig. 2.2a–c). It is known that in *Arabidopsis*, rice, maize, and tomato, JAs levels play important roles during flower development such as anthesis, sex determination, or flower abscission (Yuan & Zhang, 2015). Böttcher et al. (2015) also reported higher JA and JA-Ile contents in young grape berries followed by a dramatic reduction during progression to ripening stages. The JA-Ile biosynthesis *JAR1* gene likely encodes an indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3 (it matches 66% identity with *A. thaliana* GH3.5, Table S2.3) that uses both JA and indole-3-acetic acid as substrates in the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch and Schimp. (Ludwig-Müller et al., 2009). The *FaJAR1* genes exhibited a decreased expression from flowering to ripe fruits as well as JA-Ile levels, and that is in agreement with GH3-7 expression in grape berry (Böttcher et al., 2015). JAs' levels need to be regulated to keep

responses against stress or developmental signals (Widemann et al., 2016). In this sense, *FaJIH1.2*, an encoding gene for JIH1 that mediated JA turnover by the hydrolytic pathway (Woldemariam et al., 2012) also showed a reduction in their expression patterns in accordance with the JA levels, suggesting JA-Ile inactivation through the first stages of fruit development (Fig. 2.3b). The decrease of *JIH1* expression was associated with a reduction of the endogenous JA-Ile in *N. attenuata* leaves attenuating defense responses mediated by JA-Ile (Woldemariam et al., 2012). However, other enzymatic pathways like JA-Ile oxidation mediated by the action of cytochromes P450 of the CYP94 family could be occurring simultaneously to attenuate JAs responses (Widemann et al., 2016). In this sense, CYP94B3 and CYP94C1 catalyze the formations of 12-OH-JA-Ile and 12-COOH-JA-Ile, respectively, and increase resistance to pathogens such as *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Aubert et al., 2015; Widemann et al., 2016). In particular, we observed a transient increase in JA-Ile levels at 23 DAA (50%R stages) in the second harvest (Fig. 2.2b), for which there are no corresponding variations in the expression of *FaJAR1s* (Fig. 2.3a). These transient increases in JA-Ile level could be related to the field conditions exposed plants to several abiotic factors that could trigger variations in JAs levels (Kazan, 2015). In addition and in agreement with our results, Suza & Staswick, (2008) reported that the expression of genes encoding for biosynthesis enzymes of JA-conjugates is not always correlated with JAs levels. This fact was also observed by Böttcher et al. (2015), where the expression of *GH3-9* increases during post-veraison stages but is not accompanied by changes in JA-Ile levels during development and ripening of grape berry fruit. Also, JAs levels could change according to substrate abundance and enzymatic activity. For instance, the content of biosynthetic precursors of JAs could have an effect on bioactive JA-Ile levels (Schaller & Stintzi, 2009). In addition, Scholz et al., (2015) proposed that post-translational regulation may be necessary to activate JAs-biosynthesis enzymes that are kept inactive. Thus, the JA-Ile levels do not correlate with the *FaJAR1s* expression levels in the 50%R stage of strawberry fruit suggesting that other post-transcriptional molecular events take place to control JA-Ile levels in certain stages and environmental conditions.

Interestingly, JA-Ile content in strawberry fruit follows a similar pattern as that reported for auxin (IAA), the brassinosteroid castasterone, and gibberellin (GA1) (Symons et al. 2012) and in contrast to that reported for ABA during fruit development (Fig. 2.2g–i; Jia et al. 2011; Symons et al. 2012), suggesting that JA-Ile could play a role during early fruit development. However, salicylic acid, a defense hormone against pathogens, showed an undefined accumulation pattern during strawberry fruit ripening (Fig. S2.2). The

reduction of JA-Ile levels during fruit development correlates with the decrease of proanthocyanidin (PAs) content in fruit reported in several strawberry cultivars (Carbone et al., 2009). Additionally, early studies have shown that after a successful flower infection, the necrotrophic fungus *B. cinerea* remains quiescent in immature strawberry fruit, which can be caused by an inhibitory activity of PAs (Puhl & Treutter, 2008). Moreover, responses against *B. cinerea* are mediated by bioactive JA-Ile (Aubert et al., 2015). Thus, JA-Ile could be related to defense against pathogens and herbivory in green fruits through PAs biosynthesis.

2.5.2. OPDA Levels Decrease as Fruit Develops and Ripens Along with the Downregulation of JA Biosynthesis-Related Gene Expression.

OPDA is an oxylipin with biological activity against stress and development like JA-Ile but with a distinct signaling pathway (Stintzi et al., 2001; Goetz et al., 2012). According to our results, OPDA showed low levels at 23 and 25 DAA (50%R and R stages) suggesting a low biosynthesis of JA during fruit ripening, although a high conversion rate to JA cannot be ruled out (Fig. 2.2). JA-Ile also exhibited the lowest levels at 23 and 25 DAA (50%R and R stages) and in agreement with the expression pattern of the JA biosynthesis-related genes such as *Fa13-LOX*, *FaAOS*, *FaOPR3*, and *FaJAR1s* (Fig. 2.3a, Fig. S2.3a). In the case of *Fa13-LOX*, a similar expression was previously reported during development of *F. × ananassa* (cv. Elsanta) fruit, with a low gene expression at turning and ripe stages (Preuß et al., 2014). Nevertheless, for *FaAOS*, and *FaOPR3*, a steady decrease in transcript levels was observed from the F to R stages for cv. Aromas (Fig. S2.3a), which differs from that reported for cv. Elsanta although in this cultivar the turning and ripe stages also showed the lowest expression levels for these genes (Preuß et al., 2014).

On the other hand, when comparing the exogenous MeJA responses in terms of JA biosynthesis-related gene expression, there are some differences depending on the *Fragaria* species analyzed. In *F. chiloensis* fruits, a 100- μ M MeJA application raises transcript levels of *13-LOX*, *AOS*, and *OPR3* after 5 days of treatment (Concha et al., 2013). However, in *F. × ananassa* fruits, only *JMT* undergoes an increase after 5 days of treatment with the same MeJA concentration (Fig. 2.4e–g). These differences among cultivars and species could be related to an inter-genotype variation of gene expression as has been reported in some flavonoid synthesis-related genes (Carbone et al., 2009).

2.5.3. Exogenous MeJA Induces JA-Ile and Anthocyanin Accumulation with a Concomitant Downregulation of ABA Accumulation.

MeJA is an inductor for several responses in Chilean strawberry as defense or secondary metabolites biosynthesis especially anthocyanin accumulation (Concha et al. 2013; Saavedra et al., 2016). With the aim to study whether MeJA-dependent anthocyanin induction is accompanied by an increase in JA-Ile and changes in ABA levels, we quantified phytohormones and total anthocyanin content (as pelargonidin 3-glucoside equivalents) in MeJA-treated fruits. Remarkably, we showed for the first time in strawberry fruit that the exogenous application of MeJA involves a conversion to the bioactive JA, JA-Ile. In addition, the higher anthocyanin accumulation observed in MeJA-treated fruits was concomitant with an increase in JA, JA-Ile, and MeJA levels but only *FaJMT* was upregulated among all encoding genes for MeJA, JA and JA-Ile interconversion enzymes (Koo et al., 2013; Seo et al., 2001; Staswick & Tiryaki, 2004; Woldemariam et al., 2012) (Table 2.1; Fig. 2.4). These results suggest that OPR3 and JAR1 enzymes could be activated by posttranslational events to increase JA and JA-Ile accumulation under MeJA treatment as described previously for JA and JA-Ile biosynthesis in wounded *Arabidopsis* leaves (Koo et al. 2013; Scholz et al. 2015). Besides, we observed that OPDA levels remained stable after MeJA application in accordance with no changes in transcript accumulation of *FaI3-LOX* and *FaAOS* (Fig. 2.4a).

On the other hand, ABA is the main hormone that positively regulates strawberry fruit ripening (Jia et al. 2011; Symons et al. 2012). *NCED* encodes for an enzyme that catalyzes the conversion of violaxanthin to neoxanthin, being a key regulatory gene for the ABA biosynthesis pathway (Jia et al., 2011, 2013). Although three *NCED* genes have been identified in strawberry (that is *FaNCED1*, *FaNCED2* and *FaNCED3*), *FaNCED1* is the best characterized, and its encoded protein is more closely related to ABA biosynthesis and the strawberry ripening process (Jia et al., 2011; 2013; 2016). We observed that ABA decreased its levels after MeJA application along with a downregulation of *FaNCED1* expression (Fig. 2.5). Remarkably, the higher anthocyanin accumulation occurred in MeJA-treated fruits along with a reduction of ABA levels. ABA promotes anthocyanin accumulation at ripe strawberry stages, whereas treatment with fluridone, an inhibitor of ABA biosynthesis, inhibited the ripening process (Jia et al., 2011). Nevertheless, increased anthocyanin content in strawberry fruit could be also mediated by the activation of JA-Ile pathway as occurred in *Arabidopsis* seedlings (Shan et al., 2009). Moreover, the anthocyanin accumulation mediated by JA-Ile in strawberry fruit could be related to a stress-associated

accumulation more than the normal ripening-associated accumulation (Winkel-Shirley, 2002). In this sense, Concha et al. (2013) reported that MeJA treatment in Chilean strawberry fruit upregulated the ethylene biosynthesis-related genes along with an increase in anthocyanin accumulation. Therefore, the JA pathway could act synergistically with ethylene (Jaakola, 2013) and antagonistically with ABA for anthocyanin accumulation in strawberry fruit. In summary, we observed an increase in anthocyanin accumulation with a concomitant reduction in ABA levels after MeJA treatment, accompanied by *FaNCED1* downregulation, the encoded protein of which is a major regulator of ABA biosynthesis in strawberry fruit (Jia et al., 2011). On the other hand, anthocyanin accumulation mediated by exogenous MeJA occurs likely through upregulation of the anthocyanin biosynthesis genes such as *anthocyanidin synthase (ANS)* and *UDP glucose:flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UGT)* as previously reported in Chilean strawberry (Concha et al., 2013). Thus, the MeJA induced anthocyanin accumulation in strawberry fruit is unlikely mediated by an increase in ABA levels, but possibly by upregulation of anthocyanin biosynthesis at the transcriptional level through the activation of the JA signaling pathway (Fig. 2.6). It should be noted that MeJA applications elicit different responses in strawberry (Concha et al., 2013; Saavedra et al. 2016; Giné-Bordonaba & Terry, 2016) and non-physiological increments could be considered as stress signals for fruits. Therefore, under stress conditions mediated by JAs, an alternative pathway for anthocyanin accumulation is activated. From an applied point of view, exogenous MeJA applications have been used in strawberry both in preand postharvest periods to improve not only anthocyanin content but also fruit-quality parameters such as antioxidant capacity, reduction of decay incidence, and beneficial health properties (Flores et al., 2013; Giné-Bordonaba & Terry 2016; Saavedra et al., 2016). In this regard, with the information provided in the present study about the dynamics of endogenous JAs accumulation in developing strawberry fruit more accurate exogenous JAs applications could be carried out in terms of both concentration and timing of the application.

2.6. Conclusions.

Globally, we observed a coordinated direct relationship between reduction of oxyilipin endogenous levels and downregulation of JA metabolism-related genes during strawberry fruit development and ripening. Interestingly, ABA levels increased during strawberry fruit ripening, as has also been shown by Jia et al. (2011) and Symons et al. (2012) in other strawberry cultivars, whereas JA-Ile levels decreased during development and ripening. Besides, treatment with exogenous MeJA increased endogenous JA-Ile levels

along with a reduction of ABA levels and a decrease in *FaNCED1* transcript accumulation suggesting an antagonistic relationship from the JA to the ABA pathway in strawberry fruit (Fig. 2.6). On the other hand, the MeJA-induced anthocyanin accumulation involves increase and decrease in JA-Ile and ABA levels, respectively, suggesting that anthocyanin accumulation during fruit development could be regulated by a different pathway that needs further characterization at a molecular level.

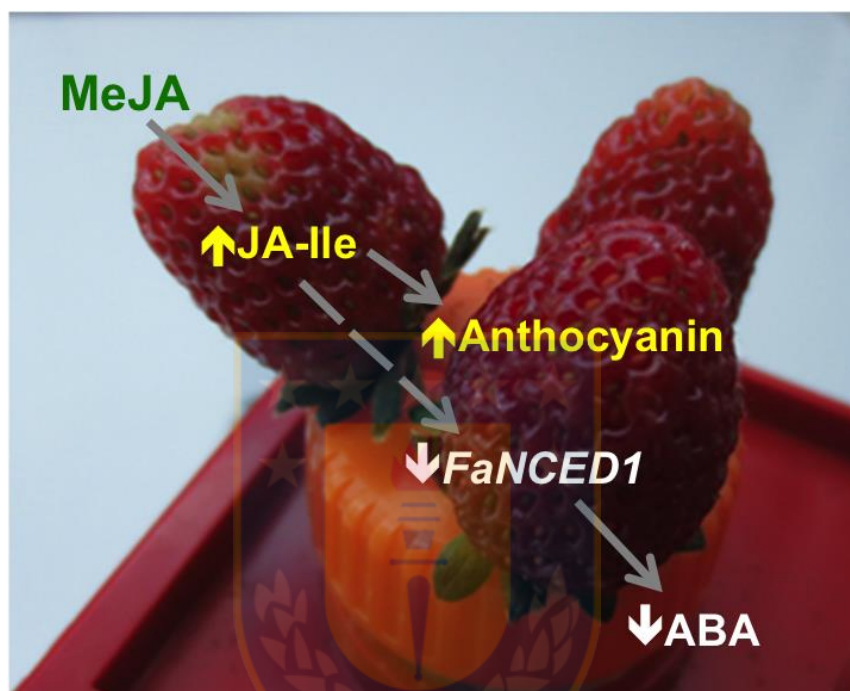


Fig. 2.6. Antagonistic relationship from JA to ABA pathway during MeJA-induced anthocyanin accumulation in strawberry fruit. When exogenous MeJA is applied to developing strawberries (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) increases in JA-Ile and anthocyanin levels were observed with a concomitant downregulation of ABA and *FaNCED1* expression levels. Exogenous MeJA induces anthocyanin accumulation possibly by upregulation of the anthocyanin biosynthesis genes (Concha et al., 2013) due to the JA-Ile increase and activation of JA signaling pathway (solid gray arrows). In turn, the *FaNCED1* downregulation is likely caused by the activation of JA signaling pathway through an unknown mechanism (dashed gray arrow), which leads to reduction of ABA levels (solid gray arrow). Scheme was generated from the results shown in Table 2.1, Figs. 2.4 and 2.5. The background photograph corresponds to representative MeJA treated fruits at 5 days of incubation. For experimental details, see the “Materials and Methods” section. ABA abscisic acid, JA-Ile jasmonoyl-isoleucine, MeJA methyl jasmonate, *FaNCED1* *Fragaria × ananassa* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase 1.

2.7. Acknowledgements

A.G.-B. acknowledges the support by the CONICYT [Grant ‘Beca Doctorado Nacional 2015 No. 21151411’]. C.R.F. thanks to the CONICYT for the acquisition of the colorimeter and texture analyzer [Grant PIA/ACT-1110]. The authors are grateful for the help of S.V. Smalley in editing the English language throughout the manuscript. In addition, the Danforth Plant Science Center offers their thanks to the National Science Foundation (NSF, USA) for the acquisition of the QTRAP LC-MS/MS [Grant No. DBI-1427621].

2.8. References.

- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F., & Heitz, T. (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Experimental Botany*, *erv190*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv190>
- Böttcher, C., Burbidge, C. A., di Rienzo, V., Boss, P. K., & Davies, C. (2015). Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. *Journal of Integrative Plant Biology*, *57*(7), 618-627. <https://doi.org/10.1111/jipb.12321>
- Carbone, F., Preuss, A., De Vos, R. C. H., D’Amico, E., Perrotta, G., Bovy, A. G., ... Rosati, C. (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment*, *32*(8), 1117-1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01994.x>
- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. (2014). «Movers and shakers» in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, *65*(17), 4705-4722. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru280>
- Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, *70*, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>
- Flores, G., Pérez, C., Gil, C., Blanch, G. P., & Ruiz del Castillo, M. L. (2013). Methyl jasmonate treatment of strawberry fruits enhances antioxidant activity and the inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1803-1809. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.012>

- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9608940>
- Giné-Bordonaba, J., & Terry, L. A. (2016). Effect of deficit irrigation and methyl jasmonate application on the composition of strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit and leaves. *Scientia Horticulturae*, 199, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.026>
- Goetz, S., Hellwege, A., Stenzel, I., Kutter, C., Hauptmann, V., Forner, S., ... Hause, B. (2012). Role of cis-12-oxo phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant Physiology*, pp.111.192658. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192658>
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 18(9), 477-483. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>
- Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., ... Fang, J. (2016). Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnology Journal*, 14(10), 2045-2065. <https://doi.org/10.1111/pbi.12563>
- Jia, H., Wang, Y., Sun, M., Li, B., Han, Y., Zhao, Y., ... Jia, W. (2013). Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *The New Phytologist*, 198(2), 453-465. <https://doi.org/10.1111/nph.12176>
- Jia, H.-F., Chai, Y.-M., Li, C.-L., Lu, D., Luo, J.-J., Qin, L., & Shen, Y.-Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, 157(1), 188-199. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>
- Jiang, Y., & Joyce, D. C. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, 39(2), 171-174. <https://doi.org/10.1023/A:1022539901044>
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20(4), 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.001>
- Koo, Y. J., Yoon, E. S., Seo, J. S., Kim, J.-K., & Choi, Y. D. (2013). Characterization of a methyl jasmonate specific esterase in Arabidopsis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(1), 27-33. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2201-7>
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines

- by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X., & Tang, K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from taxus and ginkgo. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 34(3), 209-214. <https://doi.org/10.1081/PB-200026790>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ludwig-Müller, J., Jülke, S., Bierfreund, N. M., Decker, E. L., & Reski, R. (2009). Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *The New Phytologist*, 181(2), 323-338. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02677.x>
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- Meesters, C., Mönig, T., Oeljeklaus, J., Krahn, D., Westfall, C. S., Hause, B., ... Kombrink, E. (2014). A chemical inhibitor of jasmonate signaling targets JAR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 10(10), 830-836. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1591>
- Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*, 5(6), 986-992. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.004>
- Puhl, I., & Treutter, D. (2008). Ontogenetic variation of catechin biosynthesis as basis for infection and quiescence of *Botrytis cinerea* in developing strawberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115(6), 247-251. <https://doi.org/10.1007/BF03356272>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317-343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>

- Rosquete, M. R., Barbez, E., & Kleine-Vehn, J. (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5(4), 772-786. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr109>
- Saavedra, G. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Cherian, S., & Figueroa, C. R. (2016). Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. *Food Chemistry*, 190, 448-453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.107>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1532-1538. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.032>
- Scholz, S. S., Reichelt, M., Boland, W., & Mithöfer, A. (2015). Additional evidence against jasmonate-induced jasmonate induction hypothesis. *Plant Science*, 239, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.024>
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., ... Choi, Y. D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4788-4793. <https://doi.org/10.1073/pnas.081557298>
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., & Farmer, E. E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12837-12842. <https://doi.org/10.1073/pnas.211311098>
- Suza, W. P., & Staswick, P. E. (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L: -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, 227(6), 1221-1232. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0694-4>

- Symons, G. M., Chua, Y.-J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., & Reid, J. B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers147>
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, *100*(4), 681-697. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>
- Wasternack, C., & Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, *5*(1), 63-77. <https://doi.org/10.1021/cb900269u>
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., & Heitz, T. (2016). Dynamics of Jasmonate Metabolism upon Flowering and across Leaf Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, *5*(1), 4. <https://doi.org/10.3390/plants5010004>
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(3), 218-223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T., & Galis, I. (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *72*(5), 758-767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05117.x>
- Yuan, Z., & Zhang, D. (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Current Opinion in Plant Biology*, *27*, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.024>

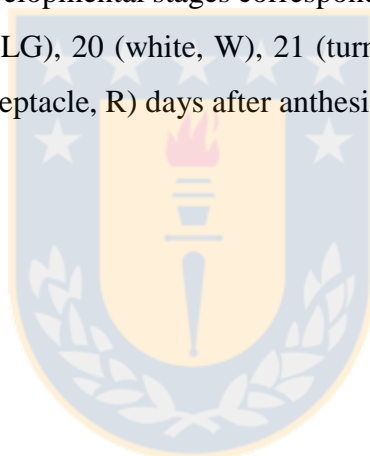
2.9. Supplementary Material.



0 (F) 10 (SG) 17 (LG) 20 (W) 21 (T) 23 (50%R) 25(R)

Days after anthesis (DAA) and developmental stages

Fig. S2.1. Developmental stages of strawberry (*Fragaria ×ananassa* cv. Aromas) used in the present research. Developmental stages corresponding to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA).



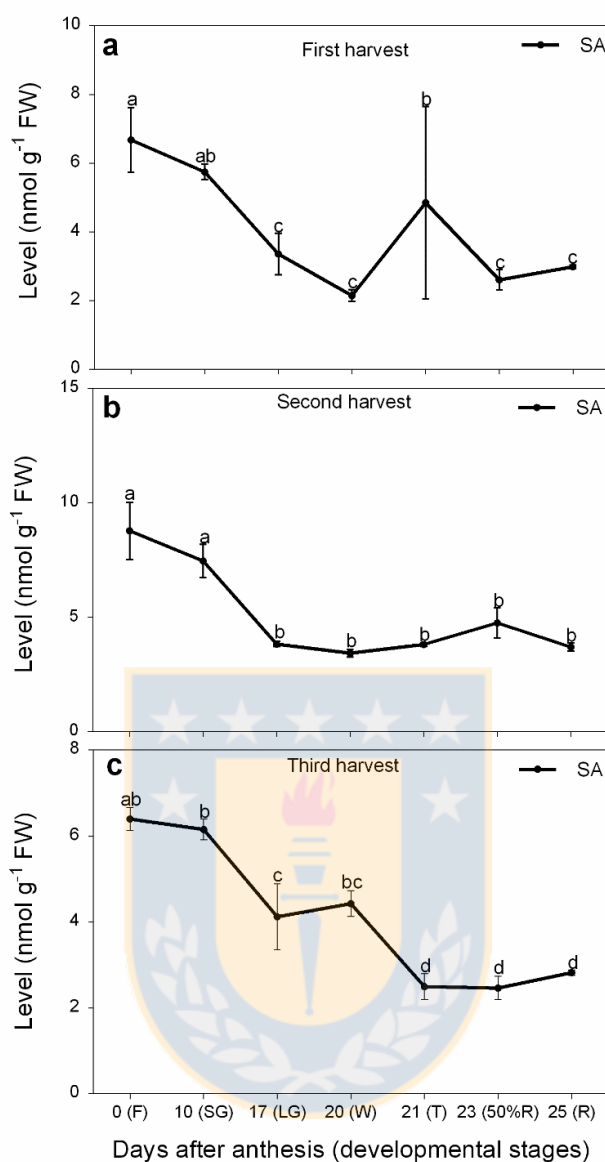


Fig. S2.2. Salicylic acid (SA) levels from flowering to ripening of strawberry. Changes in SA (a-c) levels (nmol g⁻¹ FW) analyzed during developmental stages of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit of different harvests. Developmental stages analyzed corresponding to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test and differences among means ± SE (n=3) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages (p ≤ 0.05). For experimental details see the Materials and Methods section.

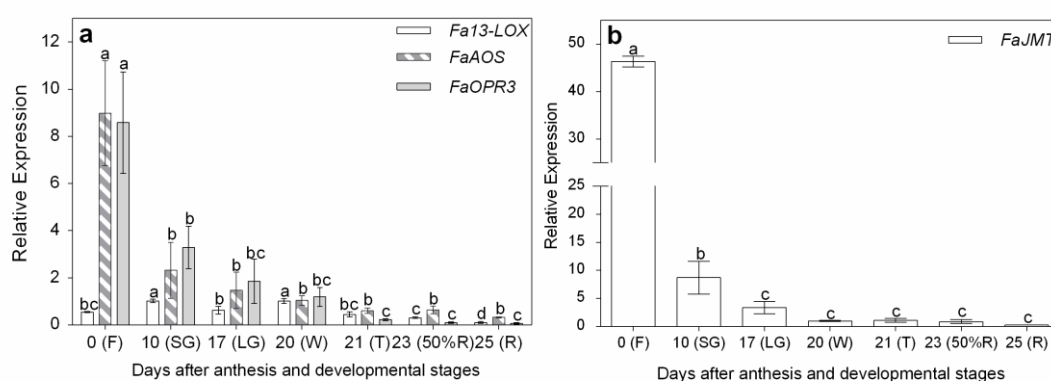


Fig. S2.3. Changes in expression of early JAs and MeJA biosynthesis-related genes from flowering to ripening of strawberry. Changes in relative expression of *Fa13-LOX*, *FaAOS*, *FaOPR3* (a) and *FaJMT* (b) genes during developmental stages of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Aromas) fruit. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test and differences among means \pm SE (n=3) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$). For experimental details see the Materials and Methods section. 13-LOX, 13-lipoxygenase; AOS, allene oxide synthase; JAs, jasmonates; JMT, jasmonic acid methyltransferase; MeJA, methyl jasmonate; OPR3, 12-oxophytodienoate reductase 3.

Table S2.1. Changes in weight (g), firmness (N), SSC/TA ratio and color at different developmental stages of strawberry (*Fragaria ×ananassa* cv. Aromas) fruit.

Fruit quality parameter	Days after anthesis (DAA) ^a					
	10 (SG)	17 (LG)	20 (W)	21 (T)	23 (50%R)	25 (R)
Weight (g)	0.59 ± 0.09 a	2.25 ± 0.29 a	6.96 ± 1.05 b	6.73 ± 1.18 b	8.10 ± 2.06 b	10.35 ± 1.77 b
Firmness (N)	4.05 ± 0.32 d	2.53 ± 0.41 c	1.13 ± 0.09 b	0.67 ± 0.01 ab	0.45 ± 0.04 a	0.22 ± 0.02 a
SSC/TA ^b	8.44 ± 1.15 ab	7.71 ± 0.97 ab	5.86 ± 0.26 a	9.28 ± 1.10 b	8.93 ± 0.60 b	17.42 ± 2.67 c
Color L*	48.58 ± 1.79 b	54.28 ± 1.39 c	63.34 ± 1.22 d	54.44 ± 1.35 c	47.89 ± 2.04 b	34.15 ± 1.58 a
a*	-9.82 ± 1.36 a	-9.05 ± 0.84 a	-4.41 ± 0.46 a	13.25 ± 4.90 b	21.96 ± 6.49 b	35.41 ± 2.02 c
b*	39.02 ± 1.42 d	35.95 ± 0.35 cd	33.31 ± 1.09 bc	30.83 ± 0.18 b	31.37 ± 0.35 b	21.20 ± 2.63 a
Chroma	40.28 ± 1.67 ab	37.16 ± 0.42 ab	33.64 ± 1.11 a	34.50 ± 1.92 ab	39.35 ± 3.86 ab	41.54 ± 3.13 b
Hue (h°)	103.96 ± 1.54 c	104.02 ± 1.27 c	97.49 ± 0.76 c	67.50 ± 7.44 b	56.78 ± 7.56 b	30.72 ± 1.90 a

^aCorrespond to developmental stages: 10 days (small green, SG), 17 days (large green, LG), 20 days (white, W), 21 days (turning, T), 23 days (50% red receptacle, 50%R), 25 days (100% red receptacle, R).

^bSSC, soluble solids content; TA, titratable acidity.

Data show mean values ± SE (n=3 of the different three harvests). For each harvest, 30 fruits were analyzed for each developmental stage. For each parameter, different letters indicate significant differences between developmental stages (LSD test, $p \leq 0.05$).

Table S2.2. Parameters of multiple reaction monitoring (MRM) transitions for quantification of phytohormones via electrospray ionization

Scan mode	Analytes ^a	Q1 ^b	Q3 ^c	Time (ms)	DP ^d (V)	EP ^e (V)	CE ^f (V)	CXP ^g (V)
-	D2-JA	211.1	58.8	40	-56	-11	-16	-7
-	JA-Ile1	322	130.1	60	-103	-4	-28	-8
-	JA-Ile2	322	171.8	40	-99	-4	-23	-8
-	OPDA1	291.2	165	60	-125	-12	-25	-10
-	OPDA2	291.2	247.3	40	-115	-12	-24	-10
-	JA1	209	58.8	60	-44	-14	-15	-7
-	JA2	209	141	40	-22	-14	-14	-7
+	MeJA	225	207	40	23	7	15	19
+	MeJA	225	151.1	60	22	7	17	19
-	D6-ABA	269	159.1	40	-50	-13	-15	-7
-	ABA1	263.2	152.9	60	-51	-11	-15	-19
-	ABA2	263.2	219	40	-74	-11	-16	-19
-	D4-SA	140.9	97.1	40	-41	-9	-23	-11
-	SA1	137	93	60	-22	-13	-20	-10
-	SA2	137	64.9	40	-19	-13	-36	-10

^aABA, abscisic acid, D2-JA, deuterated standard of jasmonic acid; D4-SA, deuterated standard of salicylic acid; D6-ABA, deuterated standard of abscisic acid; JA, jasmonic acid; JA-Ile, jasmonoyl isoleucine; MeJA, methyl jasmonate; OPDA, oxophytodienoic acid; SA, salicylic acid

^bPrecursor ion.

^cProduct ion.

^dDeclustering potential.

^eEntrance potential.

^fCollision energy.

^gCollision cell exit potential. DP, EP, CE, CXP are expressed in volts (V).

Table S2.3. Predicted mRNA sequences of *Fragaria vesca* for *Arabidopsis thaliana* JAR1, and *Nicotiana attenuata* JIH1 and MJE.

<i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Nicotiana attenuata</i> ^a			TBLASTN analysis				<i>F. vesca</i>		
Protein ^b	Accession No.	GI number	Score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	Predicted mRNA	Accession	Gene name ^c
AtJAR1	NP_001189757	334184935	823	98	0.0	66	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5-like	XM_004306646	JAR1.1
			598	96	0.0	49	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5-like	XM_004304072	JAR1.2
NaJIH1	AFR58665	404325816	630	97	0.0	70	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4	XM_004297572	JIH1.1
			615	99	0.0	69	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4	XM_004287460	JIH1.2
NaMJE	ABY59789	164507175	293	96	5e-96	57	Esterase PIR7A, transcript variant X1	XM_004300506	MJE.1
			278	96	9e-91	55	Probable esterase PIR7A	XM_004301805	MJE.2

^a*A. thaliana* and *N. attenuata* protein sequences were used as query and Refseq-rna database of *F. vesca* as subject.

^bAtJAR1, *A. thaliana* jasmonic acid-amide synthetase; NaJIH1, *N. attenuata* jasmonoyl isoleucine hydrolase; NaMJE, *N. attenuata* methyl jasmonate esterase.

^cThis refers to the genes names assigned in the present research.

Table S2.4. Primers sequences used for RT-qPCR analysis performed in this work.^a

Gene ^b	Forward sequence	Reverse sequence	Amplicon size (bp)	Efficiency (%)
<i>13-LOX</i>	TGGTGAGGCCCTAGCAGCATTGG	TCCTTTTCCGGTGAGTCCACCCTC	184	87.16
<i>AOS</i>	TACTCGCCGTGTTTTCTCCGTCC	AAGGGAAGCTGGGTTGGTTCTGCG	108	83.79
<i>OPR3</i>	TCCACGGGACTCACCTGTCTCTC	TCGTTCAACGCTCGACACCTCGTC	101	93.25
<i>JMT</i>	AATAAGCAGCGGCGAGCGAGTAGC	AAGCGATCACTGACGAGCTCTGCG	132	95.57
<i>JAR1.1</i>	TGTCTCCTCTGTGCGTTGAG	GAGTTACGGGGCACAGTGAG	93	91.29
<i>JAR1.2</i>	GGTGTGCCATTGGTTAGTGC	CACCCAATCCAGCTCTCAG	54	111.59
<i>MJE1</i>	AGCGATATCCAGTGGTGTGAG	GAGGCGAGAGCTGGTAGAAC	128	101.85
<i>MJE2</i>	GCCATGGAGATGTTCCCTCTG	ACTAGACGTCGCACCACTG	120	114.62
<i>JIH1.1</i>	GGTGCTGCACTTCATGCTTC	GCTGTTCTGGCAAAGGAACC	76	97.27
<i>JIH1.2</i>	GGAAAATTCCAAGGAGGTGGTG	ACCTCTGAACACTGGCTTGTC	148	85.75
<i>NCED1</i>	ACGACTTCGCCATTACCG	AGCATCGCTCGCATTCT	152	102.84
<i>TIFY8</i>	TACCAGCCAGCCAATGAGGCCAAC	CCGCACCACCCAAATTCATGGGAG	122	100.16
<i>GAPDH</i>	TCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	AGCAGGCAGAACCTTTCCGACAG	132	93.35

^aThe primers for *JAR1*s, *MJE*s and *JIH1*s genes were designed from the full-length cDNA sequences of *Fragaria vesca*. The primers for *13-LOX*, *AOS*, *OPR3*, *JMT* and *GAPDH* genes were obtained from Concha and others (2013) and Preuß and others (2014). The primers for *NCED1* were obtained from Jia and others (2011).

^bGene names: *13-LOX*, 13-lipoxygenase; *AOS*, allene oxide synthase; *GAPDH*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *JAR1*, jasmonic acid-amide synthetase; *JIH1*, jasmonoyl isoleucine hydrolase; *JMT*, jasmonic acid methyltransferase; *MJE*, methyl jasmonate esterase; *NCED*, 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase; *OPR3*, oxophytodieneic acid-reductase 3.

Capítulo 3:

Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening

Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N.E., Figueroa, P.M. & Figueroa, C.R. (2018). Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening. PlosOne 13, e0197118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197118>

3.1. Abstract.

Jasmonates (JAs) are signalling molecules involved in stress responses, development and secondary metabolism biosynthesis, although their roles in fleshy-fruit development and ripening processes are not well known. In strawberry fruit, it has been proposed that JAs could regulate the early development through the activation of the JAs biosynthesis. Moreover, it has been reported that JA treatment increases anthocyanin content in strawberry fruit involving the bioactive jasmonate biosynthesis. Nevertheless, JA signalling pathway, of which main components are the COI1-JAZ co-receptor and the MYC transcription factors (TFs), has not been characterized in strawberry until now. Here we identified and characterized the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) JAZ and MYC genes as well as studied their expression during development and ripening stages in commercial strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. We described twelve putative JAZ proteins and two MYC TFs, which showed high conservation with respect to their orthologs in *Arabidopsis thaliana* and in other fleshy-fruit species such as *Malus × domestica*, *Vitis vinifera* and *Solanum lycopersicum* as revealed by gene synteny and phylogenetic analyses. Noteworthy, their expression levels exhibited a significant decrease from fruit development to ripening stages in *F. × ananassa*, along with others of the JA signalling-related genes such as *FaNINJA* and *FaJAMs*, encoding for negative regulators of JA responses. Moreover, we found that main JA signalling-related genes such as *FaMYC2*, and *FaJAZ1* are promptly induced by JA treatment at early times in *F. × ananassa* fruit. These results suggest the conservation of the canonical JA signalling pathway in strawberry and a possible role of this pathway in early strawberry fruit development, which also correlates negatively with the beginning of the ripening process.

3.2. Introduction.

Jasmonates (JAs) regulate development, metabolism and tolerance against biotic and abiotic stresses (Ahmad et al., 2016; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Feussner, 2018). Their roles have not been extensively studied in fleshy fruits, although several reports have shown a role as stimulants of the phenylpropanoid pathway and ethylene biosynthesis (Cherian, Figueroa, & Nair, 2014). Moreover, JAs and related oxylipins could play an early role during strawberry and grape fruit development since 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), methyl jasmonate (MeJA), jasmonic acid (JA), and the bioactive JA jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) accumulate at flowering and immature fruit stages, and then decrease as fruit ripens (Böttcher, Burbidge, di Rienzo, Boss, & Davies, 2015; Gansser, Latza, & Berger, 1997; Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018). JAs are also involved in the anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings (Shan, Zhang, Peng, Wang, & Xie, 2009) and exogenous MeJA application induces anthocyanin biosynthesis with the concomitant upregulation of JA biosynthesis-related genes in Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit (Concha et al., 2013). In commercial strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit, after exogenous MeJA application, and coincident with the anthocyanin accumulation, JA-Ile levels increased along with anthocyanin accumulation, while the main ripening-associated hormone abscisic acid (ABA) decreased in developing treated fruit (Garrido-Bigotes et al., 2018). Recently, we characterized the dynamics of endogenous JAs during *F. × ananassa* fruit development and ripening (Garrido-Bigotes et al., 2018). A correlation between reduction of JA-Ile levels and downregulation of *FaJARI*, the key gene encoding for the JA-Ile synthesis enzyme, and the JA turnover-related genes (i.e., *FaMJE* and *FaJIH1*) was reported (Garrido-Bigotes et al., 2018). Nevertheless, the molecular characterization of the JA signalling-related components has not been performed in strawberry until now.

The physiological effects mediated by JA-Ile require activation of the signalling pathway, which has been well characterized in *Arabidopsis* (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Wasternack & Hause, 2013). The F-box CORONATINE INSENSITIVE1 protein (COI1) is part of the Skp-Cullin-F-box-type E3 ubiquitin ligase complex (SCF^{COI1}) and together with JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) form the JA-Ile receptor (Chini et al., 2007; Sheard et al., 2010; Thines et al., 2007). When JA-Ile levels are low, JAZ transcriptional repressors bind to MYC2 and additional transcription factors (TFs) repressing expression of early JA-responsive genes (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Wasternack & Hause, 2013). Moreover, Novel Interactor of JAZ (NINJA) adaptor allows the establishment of the co-repressor complex consisting of TOPLESS (TPL)

(Pauwels et al., 2010) and histone deacetylases (HDAs) (Wasternack & Song, 2017). Once JA-Ile level rises, COI1 binds to JAZs that are degraded by the 26S proteasome after ubiquitination (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Wasternack & Hause, 2013). Then MYC2 and additional TFs induce the expression of early JA-responsive genes such as *JAZs*, *MYCs* and JA biosynthetic ones (Chini et al., 2007; Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Chung et al., 2008). In *Arabidopsis*, 13 JAZ proteins have been identified until now (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016). JAZ1-12 contain the conserved TIFY and Jas domains where JAZ13 is a non-TIFY JAZ protein (Thireault et al., 2015).

The TIFY domain near N-terminal region contains the TIF[F/Y]XG motif (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Vanholme, Grunewald, Bateman, Kohchi, & Gheysen, 2007), which mediates homo- and heteromeric interactions between TIFY proteins (Chini, Fonseca, Chico, Fernández-Calvo, & Solano, 2009) and the interaction with NINJA (Pauwels et al., 2010). The Jas domain is a conserved sequence at the C-terminal region of JAZ containing a conserved SLX₂FX₂KRX₂RX₅PY motif, mediating the hormone-dependent COI1-JAZ complex formation (Sheard et al., 2010). The Jas domain is also responsible for the interaction of JAZs with MYCs, suppressing JA responses (Pauwels & Goossens, 2011). On the other hand, PEAPOD (PPD) subfamily is part of the TIFY family proteins, which contain a highly conserved TIFY domain, a degenerated Jas domain and an N-terminal PPD domain. However, until now a PPD putative role in JA response has not been described (Bai, Meng, Huang, Qi, & Chen, 2011; Vanholme et al., 2007; White, 2006). MYC2, MYC3, MYC4 and MYC5 are bHLH-like TFs that contain a basic helix-loop-helix (bHLH) domain for binding to G-box-containing promoters (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012, 2015) and the transcription is regulated by MED25 subunit (Chen et al., 2012). MYC2, MYC3 and MYC4 interact with JAZs through the JAZ-interacting domain (JID; Qi et al., 2011). Other components of JA signalling pathway are JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like1/2/3 (JAM1, JAM2 and JAM3), which are antagonistic and negative regulators of MYC-like TFs and JA responses (Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013). JAM1, JAM2 and JAM3 corresponding to bHLH003, bHLH013 and bHLH017 TFs, respectively (Fonseca et al., 2014). Therefore, JAZs together with MYCs are the main regulators for JA-Ile responses (Chini et al., 2007) including upregulation of *JAZ* genes (Chini et al., 2007; Figueroa & Browse, 2012), which encoded JAZ proteins perform a negative feedback to turn off JA-Ile-mediated responses (Chini et al., 2007). Recently, in a transcriptome analysis performed in *F. × ananassa* fruit, the repression

of a *JAZ* from green to white and partially ripe stages was reported (Wang et al., 2017). Nevertheless, a deep molecular characterization of the *JAZ* gene family and JA signalling components has not been reported in *Fragaria* species.

Thus, in this work we characterized the main JA signalling components in *Fragaria* species as *JAZs* and *MYCs*, using woodland strawberry (*Fragaria vesca*) to perform the genomic *in silico* studies and *F. × ananassa* for transcriptional analysis during fruit development and ripening and in response to JA treatment.

3.3. Materials and methods.

3.3.1. Identification and characterization of JA signalling-related genes in *F. vesca*.

Arabidopsis sequences of JA signalling-related proteins, including *JAZs* and *MYCs*, were used to search ortholog genes in *F. vesca* genome and transcriptome (Shulaev et al., 2011) by tblastn search tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Table S3.1). Sequences with higher coverage and identity, and with lower e-value were selected for further bioinformatics analysis (Table S3.1). TIFY5b-like sequence (GenBank accession number XM_011469361.1) was obtained directly from *F. vesca* transcriptome because it showed lower coverages, identities and higher e-values comparing with Arabidopsis *JAZ* proteins.

3.3.2. Mapping, duplication and synteny analysis of *JAZ* and *MYC* genes in *F. vesca* and *Arabidopsis thaliana*.

Physical chromosomal locations of *F. vesca* (*Fv*) and *Arabidopsis thaliana* (*At*) *JAZs* and *MYCs* were obtained from Arabidopsis (TAIR10, <https://www.arabidopsis.org/>) and Genome databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Gene synteny analysis were performed between the *F. vesca*, *Malus × domestica* (*Md*), *Vitis vinifera* (*Vv*), *Solanum lycopersicum* (*Sl*), *Oryza sativa* (*Os*) and *A. thaliana* genomes (Table S3.2) using information available in the Plant Genome Duplication Database (PGDD) (Lee, Tang, Wang, & Paterson, 2013).

3.3.3. Gene structure, protein sequence and phylogenetic analyses.

Exon-intron organizations of *JAZ* and *MYC* genes were determined by Gene Display Server 2.0 (Hu et al., 2015) using the information available at Genome database

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). *F. vesca* and Arabidopsis JAZ and MYC TFs sequences were analyzed for structural and functional domains. *F. vesca* JAZs and MYCs encoding sequences were obtained from *F. vesca* transcriptome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>) (Table S3.1). TIFY and Jas domains were identified through multiple sequence alignment by Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) and visualized by Jalview software (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009). Logo sequences of JAZ and MYCs domains were obtained using Weblogo 3 (Crooks, Hon, Chandonia, & Brenner, 2004). Unrooted phylogenetic trees were built using full-length amino acidic sequences by the neighbor-joining (NJ) method and a bootstrap of 1,000 replicates. Phylogenetic trees were visualized by Evolview tool (He et al., 2016). We renamed the annotated *F. vesca* TIFY and MYC sequences according to their homology degree; length, domain location and clustering in phylogenetic tree with the corresponding Arabidopsis sequences.

3.3.4. Plant material and JA treatment.

Strawberry (*F. × ananassa* cv. Aromas) flowers and fruit were collected at different developmental stages from plants grown in a commercial field at Angol, Araucanía Region, Chile (latitude 37°45'18" S; longitude 72°36'49" W) during three different dates in the 2014 growing season. The owner of the land gave permission to conduct the study on this site. The picked flowers and fruit were transported to the laboratory under refrigerated conditions and classified in six developmental stages corresponding to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, 100%R) days after anthesis (DAA) as previously reported (Garrido-Bigotes et al., 2018).

On the other hand, we performed an experiment to verify JA treatment effects on *MYC2* and *JAZs* gene expression during an in vitro fruit ripening system. Peduncles of three fruit at white stage (W) were trimmed to a uniform length of 50 mm and immersed in sterile tubes (50 ml) with autoclaved distilled water containing 88 mM sucrose and 1 mM hydroxyquinoline hemisulfate (HQS) plus 100 µM MeJA according to previously reported (Concha et al., 2013; Garrido-Bigotes et al., 2018). The fruit in solution were incubated in a growth chamber under standard fluorescent lights (16 h photoperiod and 40 µmol/m².s1 light intensity) at 24°C. Fruit sampling was performed at 15 min, 30 min, 1 h and 6 h of MeJA incubation. At each treatment and time, three biological replicates were used for gene expression analysis.

3.3.5. Gene expression analysis.

Total RNA was isolated using the CTAB method (Gasic, Hernandez, & Korban, 2004) and mini-columns for RNA purification (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Germany). The cDNA synthesis was performed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Finland) according to the manufacturer's instructions. Expression analysis of JA signalling-related genes was performed using reverse transcription-qPCR (RT-qPCR). Primer3 and Primer-BLAST tools using full-length CDS sequences of *F. vesca* as templates were utilized for primer design for each gene. Primers used for RT-qPCR are described in Table S3.3 and generated single products. *FvJAZ4-1*, *FvJAZ4-2* and *FvJAZ4-3* primers were designed in a shared sequence region by the three CDS. RT-qPCR was performed following the instructions of KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions in a PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Finland). The expression levels were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) and expressed in relative arbitrary units, normalized according to housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). The PCR conditions were as follows: 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 72°C for 15 s; and a melting curve of 60°C for 30 s, 95°C for 15 s and 20°C for 10 min. All RT-qPCR reactions were performed with three biological and three technical replicates. The Heatmapper software (Babicki et al., 2016) was used to estimate the fold-change of gene expression.

3.3.6. Determination of anthocyanins and proanthocyanidins (PAs) contents.

Five grams of frozen fruit skin tissue without achenes were grounded with liquid nitrogen, homogenized with 15 ml of acetone/water (80/20 v/v) and stored at -20°C until use. Anthocyanins quantification was performed according to previously reported (Giusti & Wrolstad, 2001). Briefly, 50 µl of fruit extract and 150 µl of corresponding buffer were dispensed into a 96-well plate. The absorbance was measured at 509 nm and 700 nm, considering $\epsilon = 17,330 \text{ L/cm}^1.\text{mol}^{-1}$. The results were expressed as mg of pelargonidin-3-glucoside equivalents per 100 g of fresh weight (FW). PAs content was measured according to previously reported (Prior et al., 2010). Briefly, 70 µl of fruit extract diluted (1/10, v/v) and 210 µl of dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) reagent were dispensed into wells of a 96-well plate. The microplate was read for 20 min at 640 nm. The concentration was calculated from a calibration curve, using catechin as standard. The results were expressed as mg of catechin equivalents per 100 g of FW.

3.4. Results.

3.4.1. Identification, chromosomal location and synteny of *JAZ* and *MYC* genes in *F. vesca*.

In order to identify ortholog *JAZ* and *MYC* genes in *F. vesca*, a tblastn search was performed using Arabidopsis *JAZ*s and *MYC*s protein sequences as queries (Table S3.1). In *F. vesca*, we identified and named 12 non-redundant members (*FvJAZ1*, *FvJAZ4-1*, *FvJAZ4-2*, *FvJAZ4-3*, *FvJAZ5*, *FvJAZ7*, *FvJAZ8.1*, *FvJAZ8.2*, *FvJAZ9*, *FvJAZ10*, *FvJAZ11* and *FvJAZ12*), which are annotated as TIFY proteins in *F. vesca* database (Table 3.1, Table S3.1 and S3.4). Due to the similar number of *JAZ*s in *F. vesca* and Arabidopsis, we decided to name the *F. vesca* *JAZ* according to their well-studied Arabidopsis ortholog genes. Moreover, we identified two *MYC* transcription factors, *FvMYC2* and *FvMYC2-like*, which are annotated as *MYC2* and *MYC2-like* in *F. vesca* databases (Table S3.1 and S3.5). However, Arabidopsis *MYC3*, *MYC4* and *MYC5* orthologs were not identified in *F. vesca* databases.

Next, we compared chromosomal locations of *JAZ* and *MYC* genes and constructed a schematic representation of their distribution (Fig. 3.1) based on information available from *F. vesca* and Arabidopsis genome databases (Table 3.1 and Table S3.2). The *FvJAZ* genes were located on chromosomes 1, 3, 4, 5 and 6, while *FvMYC2* and *FvMYC2-like* did on chromosomes 5 and 7, respectively (Fig. 3.1, Table 3.1 and Table S3.2). However, *FvJAZ11* could not be located in *F. vesca* genome (Fig. 3.1, Table 3.1 and Table S3.2), likely because of *F. vesca* genome is not completely assembled (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3314>). Additionally, we searched and detected conserved syntenic regions corresponding to segmental duplications between *JAZ* and *MYC* genes of *F. vesca* and Arabidopsis using the Plant Genome Duplication Database (PGDD). *FvJAZ1*, *FvJAZ8.1* and *FvJAZ12* exhibited synteny with their Arabidopsis ortholog genes and *FvJAZ8.1* and *FvJAZ12* showed an additional synteny with near ortholog genes *AtJAZ7* and *AtJAZ11*, respectively (Fig. 3.1 and Table S3.1). We found a tandemly duplication in *F. vesca* genome corresponding to *FvJAZ8.1* and *FvJAZ8.2* genes (Fig. 3.1 and Table S3.1). *FvJAZ5* and *FvJAZ9* showed synteny with *AtJAZ6* and *AtJAZ3* and *AtJAZ4*, respectively (Fig. 3.1). Other genes such as *FvJAZ4-1*, *FvJAZ4-2*, *FvJAZ4-3*, *FvJAZ7*, *FvJAZ8.2*, *FvJAZ10* and *FvMYC2-like* could not be mapped to syntenic regions into Arabidopsis genome (Fig. 3.1). *FvMYC2* showed synteny with its *AtMYC2* ortholog gene (Fig. 3.1 and

Table 3.1. Genomic data of JAZ and MYC gene families in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) and Arabidopsis, and their corresponding CDS and protein lengths.

JAZ, Jasmonate ZIM-domain; PPD, PEAPOD.

Gene name ¹	Gene ID	Chromosome	Start	End	Gene (bp)	CDS (bp)	ORF (aa)
<i>FvJAZ1 / FvTIFY10A</i>	101302102	1	6964291	6965689	1349	909	302
<i>FvJAZ4-1 / FvTIFY6B.1</i>	101298700	4	19330995	19333777	1934	1158	385
<i>FvJAZ4-2 / FvTIFY6B.2</i>	101298700	4	19330995	19333777	1960	1155	384
<i>FvJAZ4-3 / FvTIFY6B.3</i>	101298700	4	19330995	19333777	1701	1083	360
<i>FvJAZ5 / FvTIFY11A-like</i>	101305492	6	24774113	24774773	1016	558	185
<i>FvJAZ7 / FvTIFY5B</i>	105352369	6	27798266	27799489	814	372	123
<i>FvJAZ8.1 / FvTIFY5A</i>	101295112	3	2612521	2613468	862	393	130
<i>FvJAZ8.2 / FvTIFY5B-like</i>	105350256	3	2616234	2616765	794	420	139
<i>FvJAZ9 / FvTIFY6B</i>	101303423	5	9961254	9964696	1678	1116	371
<i>FvJAZ10 / FvTIFY9</i>	101299545	1	1660803	1661807	1489	576	191
<i>FvJAZ11 / FvTIFY3A-like</i>	105349490	Unknown	159768	161085	561	561	186
<i>FvJAZ12 / FvTIFY3B</i>	101312185	1	7358182	7359713	1172	609	202
<i>FvMYC2</i>	101299702	7	2955350	2956825	1955	1476	491
<i>FvMYC2-like</i>	101308180	5	21462454	21464502	2690	2049	682
<i>FvPPD1-1</i>	101296196	4	5473109	5477786	1648	1034	344
<i>FvPPD1-2</i>	101296196	4	5473109	5477786	1576	962	320
<i>AtJAZ1 / AtTIFY10A</i>	AT1G19180	1	6622312	6623271	1892	762	253
<i>AtJAZ2 / AtTIFY10B</i>	AT1G74950	1	28148919	28150258	1873	750	249
<i>AtJAZ3 / AtTIFY6B</i>	AT3G17860	3	6119968	6122691	3338	1059	352
<i>AtJAZ4 / AtTIFY6A</i>	AT1G48500	1	17931658	17934255	3273	834	310
<i>AtJAZ5 / AtTIFY11A</i>	AT1G17380	1	5955654	5957070	2357	825	274
<i>AtJAZ6 / AtTIFY11B</i>	AT1G72450	1	27274336	27276136	2595	810	269
<i>AtJAZ7 / AtTIFY5B</i>	AT2G34600	2	14573172	14573718	923	447	148
<i>AtJAZ8 / AtTIFY5A</i>	AT1G30135	1	10596516	10597095	990	396	131
<i>AtJAZ9 / AtTIFY7</i>	AT1G70700	1	26654951	26656804	2822	804	243
<i>AtJAZ10 / AtTIFY9</i>	AT5G13220	5	4219001	4220502	2292	504	197
<i>AtJAZ11 / AtTIFY3A</i>	AT3G43440	3	15367670	15369774	2612	717	238
<i>AtJAZ12 / AtTIFY3B</i>	AT5G20900	5	7090883	7092201	1836	564	187
<i>AtJAZ13</i>	AT3G22275	3	7878807	7879810	827	378	125
<i>AtMYC2</i>	AT1G32640	1	11799042	11800913	3289	1872	623
<i>AtMYC3</i>	AT5G46760	5	18974231	18976009	2569	1779	592
<i>AtMYC4</i>	AT4G17880	4	9933702	9935471	2360	1770	589
<i>AtMYC5</i>	AT5G46830	5	19002719	19004254	1821	1536	511
<i>AtPPD1</i>	AT4G14713	4	8426677	8429720	1544	942	313
<i>AtPPD2</i>	AT4G14720	4	8431973	8435105	1598	947	315

¹*F. vesca* (*Fv*) and Arabidopsis (*At*) gene sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information NCBI, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) and Arabidopsis database (TAIR10, <http://www.arabidopsis.org>), respectively.

Table S3.1). Moreover, chromosome location and synteny analysis of *M. × domestica*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera* and *O. sativa* JAZ and MYC-like genes was performed respect *A. thaliana* orthologs, using information available in PGDD and species-genomic databases (Fig. S3.1 and Table S3.2). *V. vinifera* displayed higher number of JAZ and MYC-like syntenic genes respect to *A. thaliana* genes (Fig. S3.1). An additional non-annotated

VvMYC2-like gene showed synteny with *AtMYC2* (Fig. S3.1). In the case of *M. × domestica*, *S. lycopersicum* and *O. sativa*, only four syntenic regions were detected for each one (Fig. S3.1). In summary, *FvJAZ* and *FvMYC* are orthologs and syntenic genes respect to *A. thaliana* ones, similarly to *M. × domestica*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* and *O. sativa*.

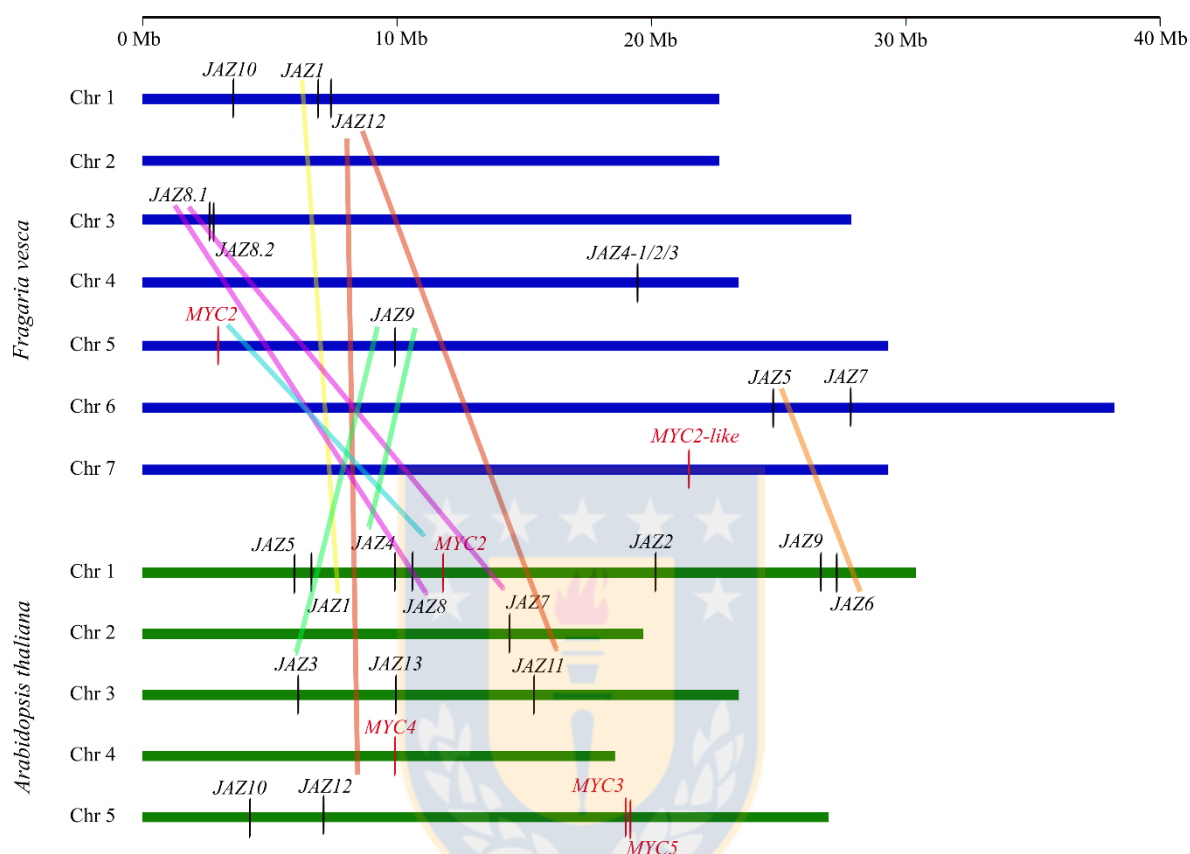


Fig. 3.1. Genome distribution and synteny of JAZ and MYC genes in *Fragaria vesca* and *Arabidopsis thaliana* chromosomes. Chromosomes are indicated as horizontal blue and green bars. JAZs are indicated by black letters and vertical lines and MYCs-like are indicated by red letters and vertical lines. Thick colored lines denote syntenic regions. *FvJAZ11* has unknown location. JAZ, jasmonate ZIM-domain.

3.4.2. Exon-intron structure analysis for JAZ and MYC genes in *F. vesca*.

In order to gain insights into the diversification of the JAZs and MYCs, we compared exon-intron organization among all genes of *F. vesca* and *Arabidopsis* (Fig. 3.2). We observed that *FvJAZs* and *AtJAZs* contain a variable intron numbers (Fig. 3.2A); in contrast, all *FvMYC* and *AtMYC* genes lack introns (Fig. 3.2B). We detected variations in length and number of introns in *FvJAZ* genes. *FvJAZ10* and *FvJAZ12* maintained the number of introns, although with length variations, with respect to *Arabidopsis* orthologs (Fig. 3.2A). Other *FvJAZ* genes such as *FvJAZ4s*, *FvJAZ5*, *FvJAZ7*, *FvJAZ8.1*, *FvJAZ8.2* and *FvJAZ9* showed

variable numbers of introns from one to six (Fig. 3.2A). On the other hand, *FvJAZ1* gained three introns and *FvJAZ4s* and *FvJAZ7* genes gained one intron each one; while *FvJAZ5*, *FvJAZ8.1*, *FvJAZ9* and *FvJAZ11* lost two, one, five and three introns, respectively, regarding their Arabidopsis ortholog genes (Fig. 3.2A). Moreover, *FvMYC2* and *FvMYC2-like* lack introns (Fig. 3.2B) as well as *A. thaliana* orthologs. Overall, some *FvJAZ* genes display a variable exon-intron organization, while *FvMYC2* and *FvMYC2-like* genes keep the lack of introns.

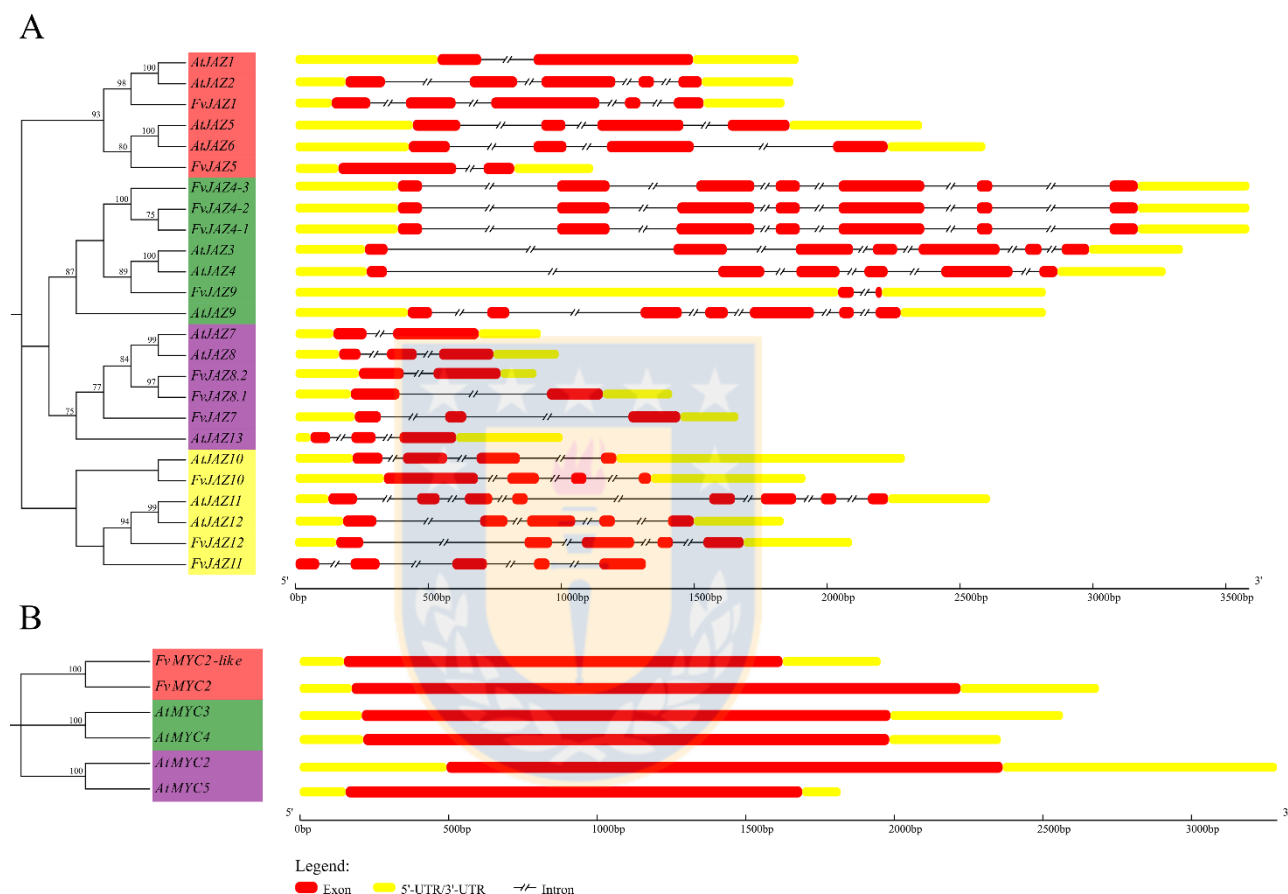


Fig. 3.2. Exon-intron structures of the *Fragaria vesca* and Arabidopsis JAZ and MYC genes. Exon-intron organization of JAZ genes (A) and MYC genes (B) in *F. vesca* (*Fv*) and *Arabidopsis thaliana* (*At*) grouped according their gene orthology. Yellow and red bars indicate untranslated (UTR) regions and exons, respectively. Black interrupted lines indicate introns. JAZ, jasmonate ZIM-domain.

3.4.3. Conserved domains of JAZ and MYC proteins in *F. vesca*.

To confirm evolutionary relationships and gain further insights in the primary protein structure between JAZ proteins, the domain and motifs positions were evaluated (Figs. 3.3 and 3.4). *FvJAZ* proteins showed a length range from 123 to 385 amino acid residues according to that observed in Arabidopsis (Table 3.1 and Table S3.6). The distribution of

domains is similar between protein sequences of *F. vesca* and their orthologs in Arabidopsis (Fig. 3.3A). Analysis of the deduced amino acid sequence of *F. vesca* JAZ showed the conservation of the TIFY/ZIM and Jas domains (Fig. 3.4A and 4B). In *F. vesca*, the TIFY domain displayed the highly conserved TIFY[F/Y]XG motif (Fig. 3.4A), although with TVFYXG and TIFFXG variants present in FvJAZ10 and FvJAZ11, respectively (Fig. 3.4A). Jas domain displayed conserved sequence SLX2FLXKR[K/R]X[R/E] like consensus sequence in *F. vesca* (Fig. 3.4B). Although some proteins like FvJAZ7, FvJAZ8.1 and FvJAZ8.2 showed a variant Jas sequence (Fig. 3.4B and Fig. S3.3). FvJAZ10 exhibited the canonical degron LPIARK whereas other *F. vesca* JAZ proteins exhibited variations in degron amino acid residues such as IPMQRK in FvJAZ1, IPQARK in FvJAZ4s, LPIMRR in FvJAZ5, VPQARK in FvJAZ9, IPLARR in FvJAZ11 and FPIARR in FvJAZ12 (Fig. 3.4B). FvJAZ11 did not show the duplicated TIFY and Jas domains that are present in AtJAZ11 (Fig. 3.3A). On the other hand, C-terminal X5PYX2 region, which may act as Nuclear Localization Signal (NLS) exhibited conservation among JAZ proteins of *F. vesca* (Fig. 3.4B). In this regard, FvJAZ5 showed an EAR-motif at the C-terminus, while FvJAZ7, FvJAZ8.1 and FvJAZ8.2 displayed this motif at the N-terminus (Fig. 3.3A and Fig. S3.2). In the case of FvJAZ5, we noticed that it lacks the DLNEPT motif or similar sequence (Panel A in Fig. S3.2). TIFY and Jas domain logo sequences showed a highly residue conservation in FvJAZ proteins (Fig. 3.5A and 3.5B). On the other hand, domain structure and sequences analysis of FvMYC TFs were evaluated and compared with their Arabidopsis orthologs (Figs. 3.3B, 3.4C and 3.4D). FvMYC2 and FvMYC2-like showed two conserved domains corresponding to JID and bHLH and displayed conserved position and different domain lengths (Figs. 3.3B, 3.4C and 3.4D). Deduced consensus sequences of FvMYC2 and FvMYC2-like JID domain showed conservation between some amino acidic residues (Fig. 3.4C), while bHLH domain displayed highly similarity between MYC-like proteins (Fig. 3.4D). FvMYC2-like contain amino acidic residues more similar to AtMYC5 (Fig. 3.4D). The logo sequences of JID and bHLH domains indicated high conservation of residues in FvMYC proteins (Fig. 3.5C-D). Globally, FvJAZs and FvMYCs contain domains highly conserved, with similar domain locations and protein lengths.

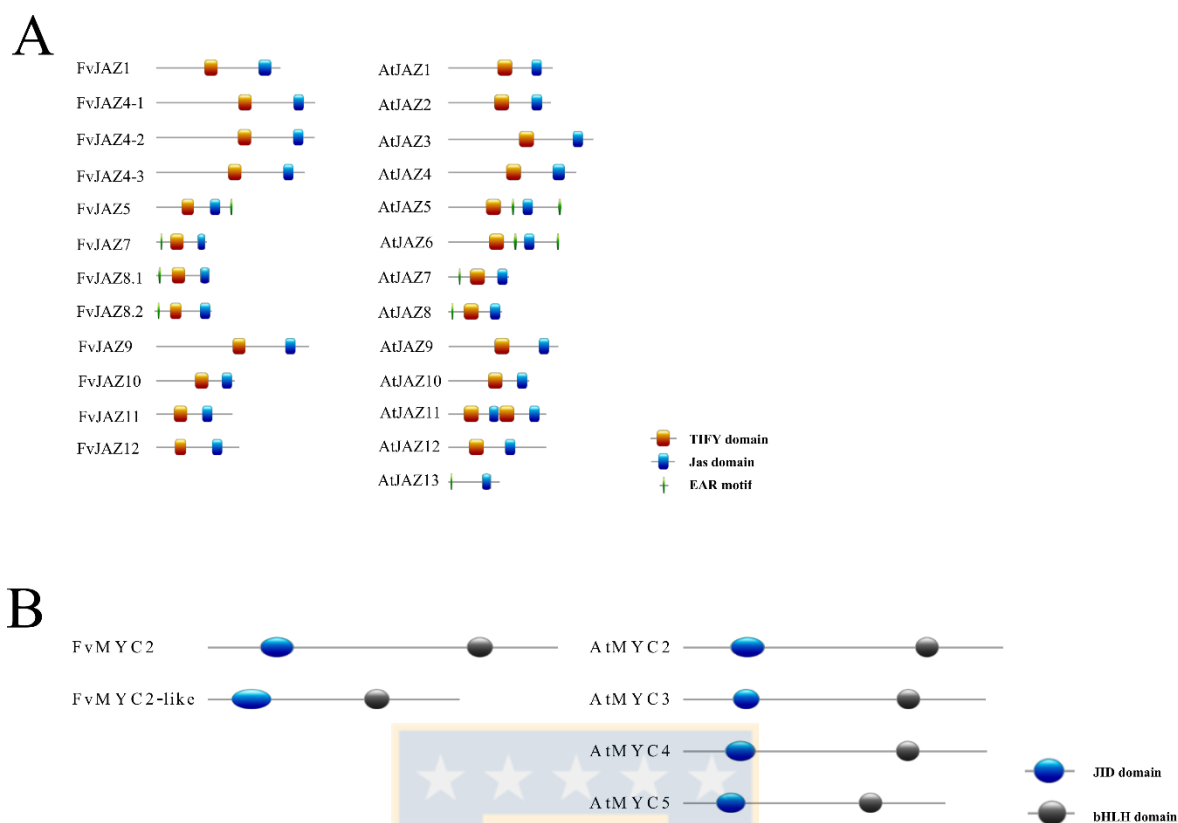


Fig. 3.3. Distribution of JAZ and MYC protein domains and motifs in *Fragaria vesca* and *Arabidopsis*. Comparative distribution of TIFY, Jas and EAR domains and motifs in JAZ proteins (A) and comparative distributions of JID and bHLH domains in MYC-like proteins (B) of *Fragaria vesca* (*Fv*) and *Arabidopsis thaliana* (*At*). The relative position of each domain within each protein are displayed in colors. bHLH, basic helix-loop-helix; EAR, ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression; JAZ, jasmonate ZIM-domain; JID, JAZ-interacting domain.

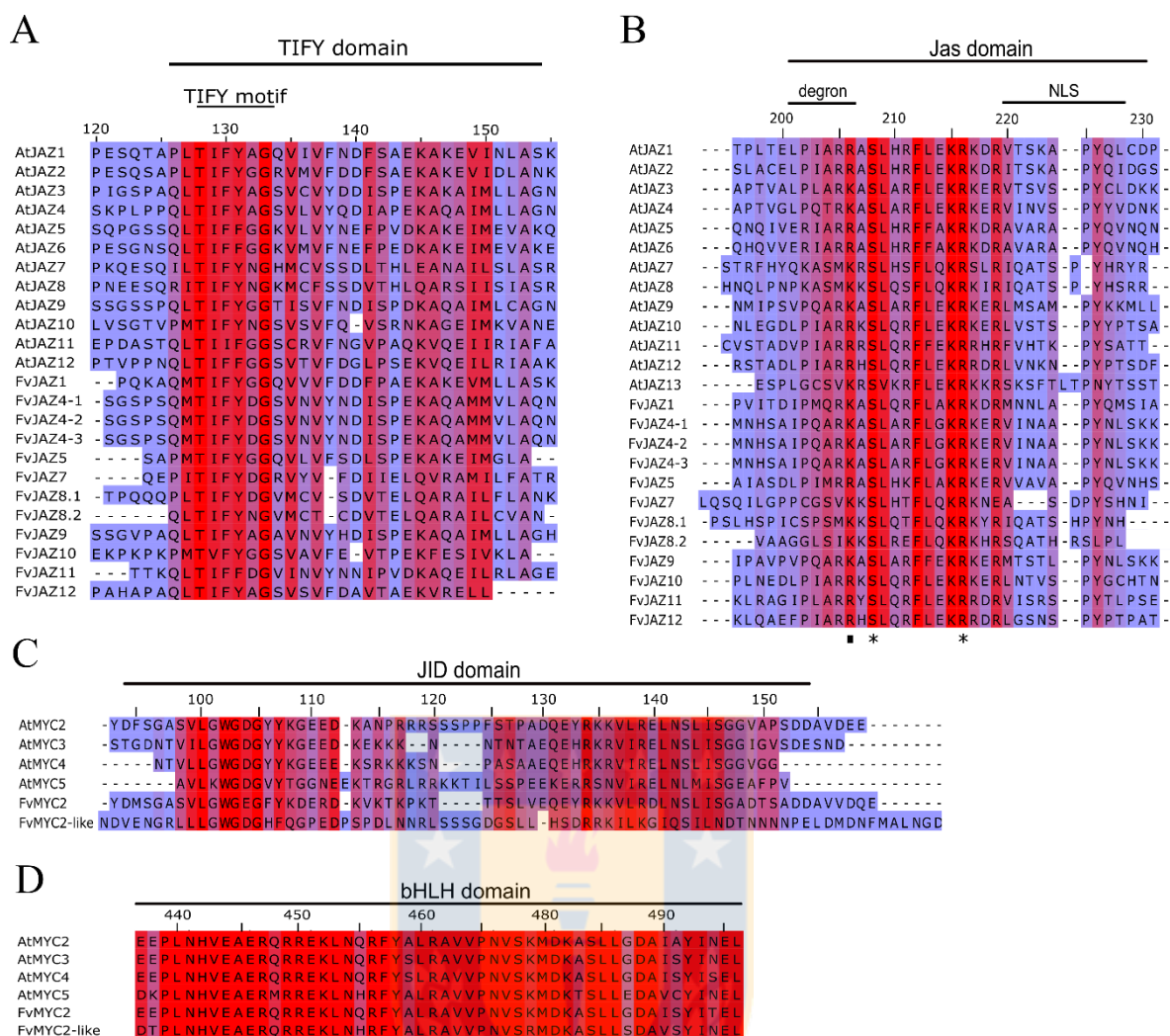


Fig. 3.4. Multiple alignment of JAZ and MYC protein domains in *Fragaria vesca* and *Arabidopsis*. Multiple sequence alignment of TIFY (A), Jas (B), JID (C) and bHLH (D) domains of *Arabidopsis* and putative *F. vesca* JAZ and MYC sequences. Red and blue colors indicate higher and lower amino acidic residues conservation, respectively. Dot and asterisks indicate conserved residues involved in interaction with COII and MYCs, respectively. bHLH, basic helix-loop-helix; JAZ, jasmonate ZIM-domain; JID, JAZ-interacting domain; NLS, nuclear localization signal.

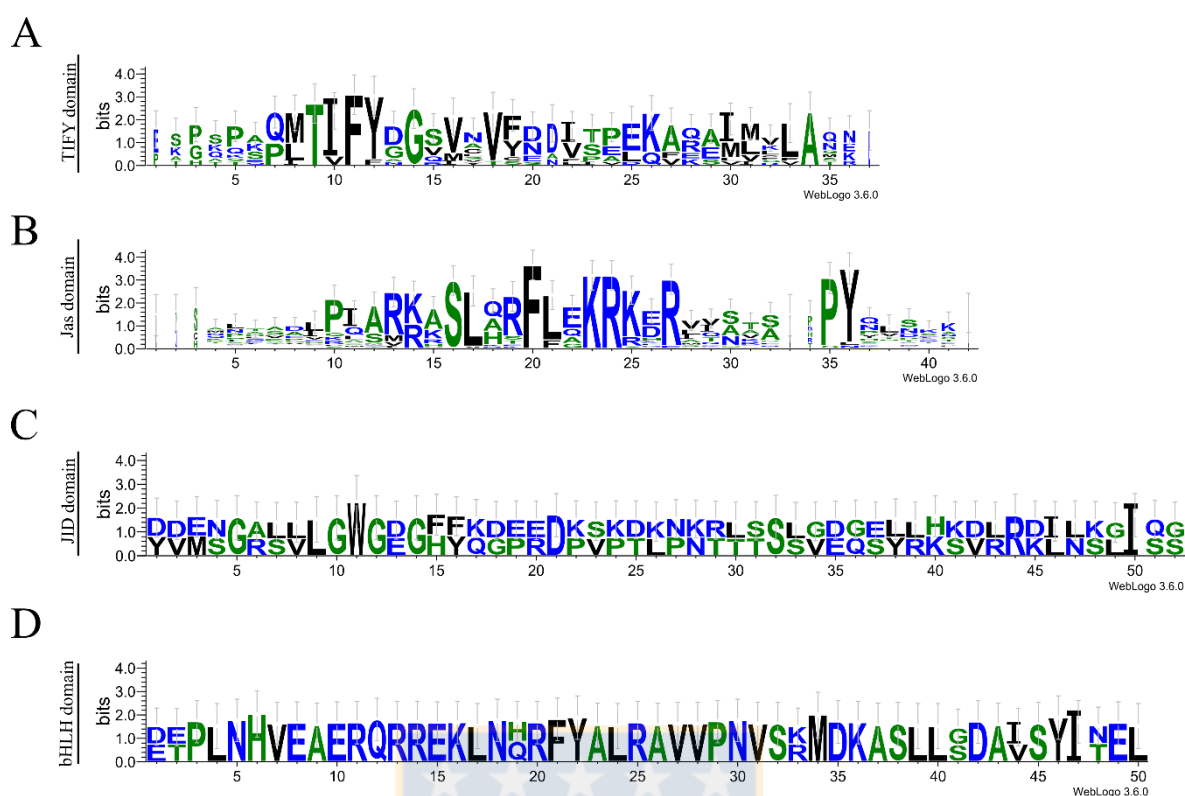


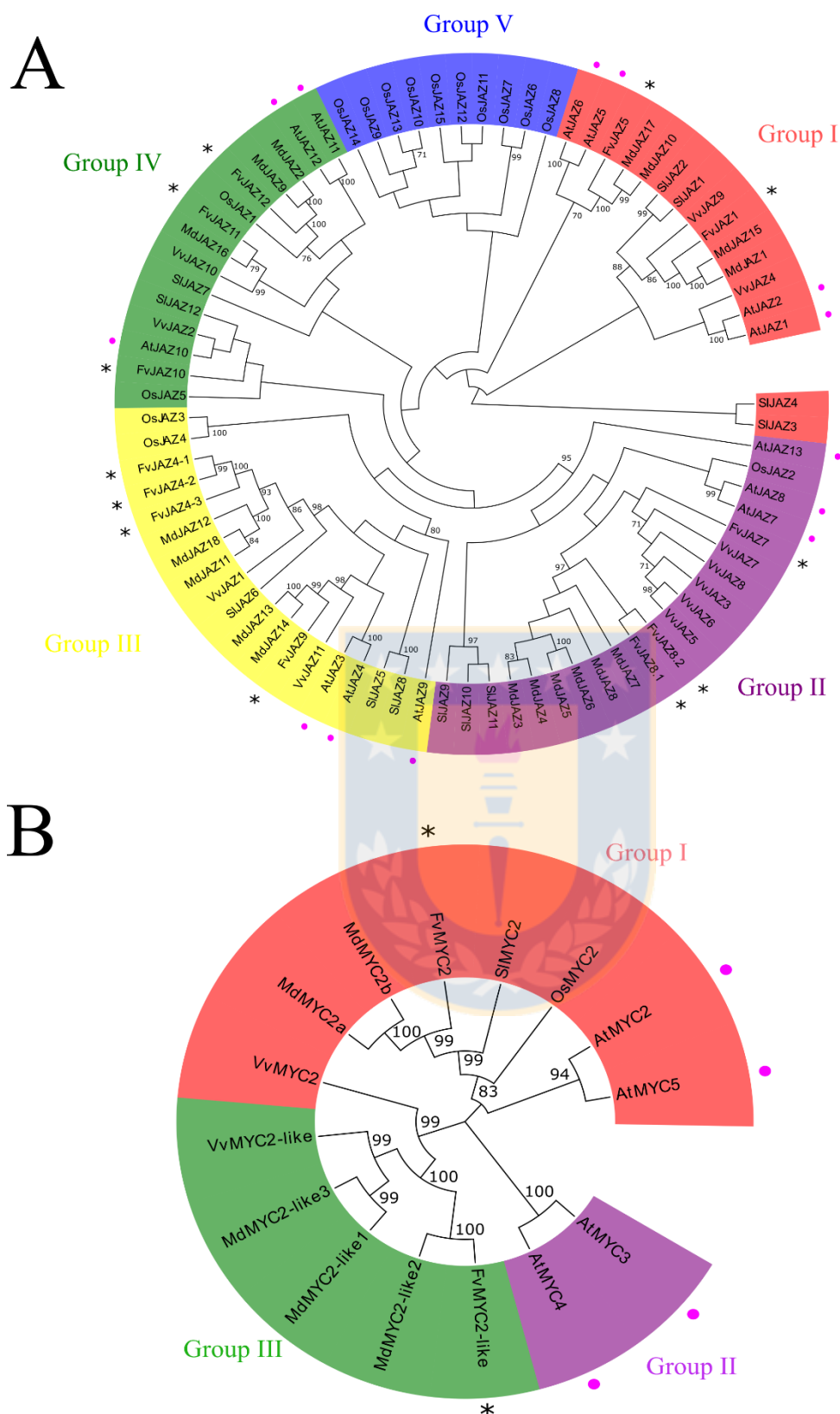
Fig. 3.5. Logo sequences for FvJAZ and FvMYC proteins. Logo sequences for TIFY (A), and Jas (B) domains of FvJAZ proteins, and JID (C) and bHLH (D) domains of FvMYC proteins. bHLH, basic helix-loop-helix; JID, JAZ-interacting domain; JAZ, jasmonate ZIM-domain.

3.4.4. Phylogenetic analysis of *F. vesca* JAZ and MYC2-like proteins.

Unrooted phylogenetic trees were generated by neighbor-joining (NJ) algorithm by bootstrap of 1,000 replicates, showing evolutionary relationships between the JAZ and MYC2-like proteins of the dicot plants such as *A. thaliana*, *F. vesca*, *M. × domestica*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* and the monocot *O. sativa*. JAZ proteins were clustered in five groups (Fig. 3.6). Regarding to the JAZ protein subfamilies, FvJAZ1 and FvJAZ5 were clustered together with AtJAZ1, AtJAZ2, AtJAZ5 and AtJAZ6 proteins into group I together some *M. × domestica*, *V. vinifera* and *S. lycopersicum* ortholog proteins (Fig. 3.6A) and showed 40.1–43.9% identity with the *A. thaliana* orthologs AtJAZ1 and AtJAZ5, respectively (Table S3.4). Otherwise, in group II, FvJAZ7, FvJAZ8.2 and FvJAZ8.1 clustered together (Fig. 3.6A) and showed between 36.8–47% identity with their corresponding *A. thaliana* orthologs (Table S3.4), and clustered in the same group of the non-TIFY protein AtJAZ13 and *M. × domestica*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* JAZs and OsJAZ2 proteins (Fig. 3.6A). On the other hand, FvJAZ4s and FvJAZ9 were grouped into

group III together with AtJAZ3, AtJAZ4 and AtJAZ9 including JAZ proteins from other species (Fig. 3.6A). Finally, *A. thaliana* and *F. vesca* JAZ10, JAZ11 and JAZ12 proteins were clustered in the group IV (Fig. 3.6A). Nevertheless, FvJAZ10 and FvJAZ11 showed higher similarity with AtJAZ4 on the sequence identity matrix (Table S3.4), which was not reproduced in the phylogenetic tree position (Fig. 3.6A). Additionally, some *O. sativa* JAZ proteins were clustered together in group V displaying divergence with dicots-associated JAZs (Fig. 3.6A). Bootstrap values showed (> 70%) indicated high reliability in most clusters (Fig. 3.6A), and values $\geq 95\%$ represented groupings with the higher confidence.

To analyze the evolutionary relationships between MYC-like TFs of *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* and *O. sativa*, an unrooted phylogenetic tree was performed (Fig. 3.6B). FvMYC2 showed the highest identity (58.5%) with AtMYC2 (Table S3.5) and it was clustered in the group I close to AtMYC2 in the phylogenetic tree (Fig. 3.6B). Other MYC2 TFs corresponding to *M. × domestica*, *S. lycopersicum* and *O. sativa* were also clustered in this group (Fig. 3.6B). On the other hand, FvMYC2-like was grouped into group II along with VvMYC2-like TFs (Fig. 3.6B). AtMYC3 and AtMYC4 were clustered together in a group III (Fig. 3.6B). Phylogenetic tree nodes showed bootstrap values $\geq 95\%$, except for OsMYC2, exhibiting high confidence levels (Fig. 3.6B). In summary, FvJAZ, FvMYC2 and FvMYC2-like proteins share high similarity and show closer evolutionary relationships within dicots (*F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *S. lycopersicum* and *V. vinifera*).



full-length JAZ and MYC protein sequences. FvJAZ and FvMYC2-like, and AtJAZ and AtMYC-like proteins are indicated by asterisk and pink dots, respectively. Nodes with bootstrap values $> 70\%$ are labelled and bootstrap values $\geq 95\%$ show highlight bootstrap. JAZ, jasmonate ZIM-domain.

3.4.5. Expression of *FaJAZ* and *FaMYC* genes during development and ripening of *F. × ananassa* fruit.

To determine the expression dynamics of *FaJAZ* and *FaMYC* genes during fruit development and ripening, RT-qPCR assays were performed, and expression changes were represented by heatmaps (Figs. 3.7A, Table S3.7 and Table S3.8). We included in the analysis the JA-Ile co-receptor COI1-encoding gene (*FaCOI1*), which showed two peaks in expression levels at F and T stages during fruit development and ripening (Fig. 3.7A). Overall, *F. × ananassa* JAZ encoding genes (*FaJAZs*) were downregulated from 0 to 25 DAA (F to R stages) (Fig. 3.7A). Notably, the expression of *FaJAZ1*, *FaJAZ5* and *FaJAZ8.1* exhibited the highest reduction by 1043, 125 and 157-fold (p-value ≤ 0.05), respectively, from 0 to 25 DAA stages (F to R stages) (Fig. 3.7A and Table S3.7). These genes showed a similar expression pattern consisting in a reduction by 3.6, 2.3 and 3.4-fold (p-value ≤ 0.05) from 0 to 10 DAA (F to SG stages), a steady level from 10 to 21 DAA (SG to T stages), and then a reduction by 6.2, 4.3 and 6.8-fold (p-value ≤ 0.05), respectively, to 23 DAA (50%R stage) (Fig. 3.7A and Table S3.7). In contrast, the expression of *FaJAZ10* and *FaJAZ12* presented a similar reduction pattern from 0 to 25 DAA stages (F to R stages), being this reduction more pronounced for *FaJAZ10* with undetected levels at 23 and 25 DAA (50%R and R stages) (Fig. 3.7A and Table S3.7). Other JAZ genes (e.g., *FaJAZ4s*, *FaJAZ8.2*, *FaJAZ9*, *FaJAZ11*) also exhibited a higher expression at F stage and then lower constant levels during fruit development and ripening (Fig. 3.7A). *FaMYC2* and *FaMYC2-like* showed an expression reduction during fruit development in a similar way to that observed for *FaJAZs* (Fig. 3.7A) although a greater expression decline was observed for *FaMYC2* than *FaMYC2-like* between 0 and 10 DAA (F and SG stages) (Fig. 3.7A and Table S3.7). Higher relative expression levels were observed for *FaMYC2* and *FaMYC2-like* in 0 and 10 DAA (F and SG stages) and a constant decrease was registered through fruit development and ripening (Fig. 3.7A and Table S3.7).

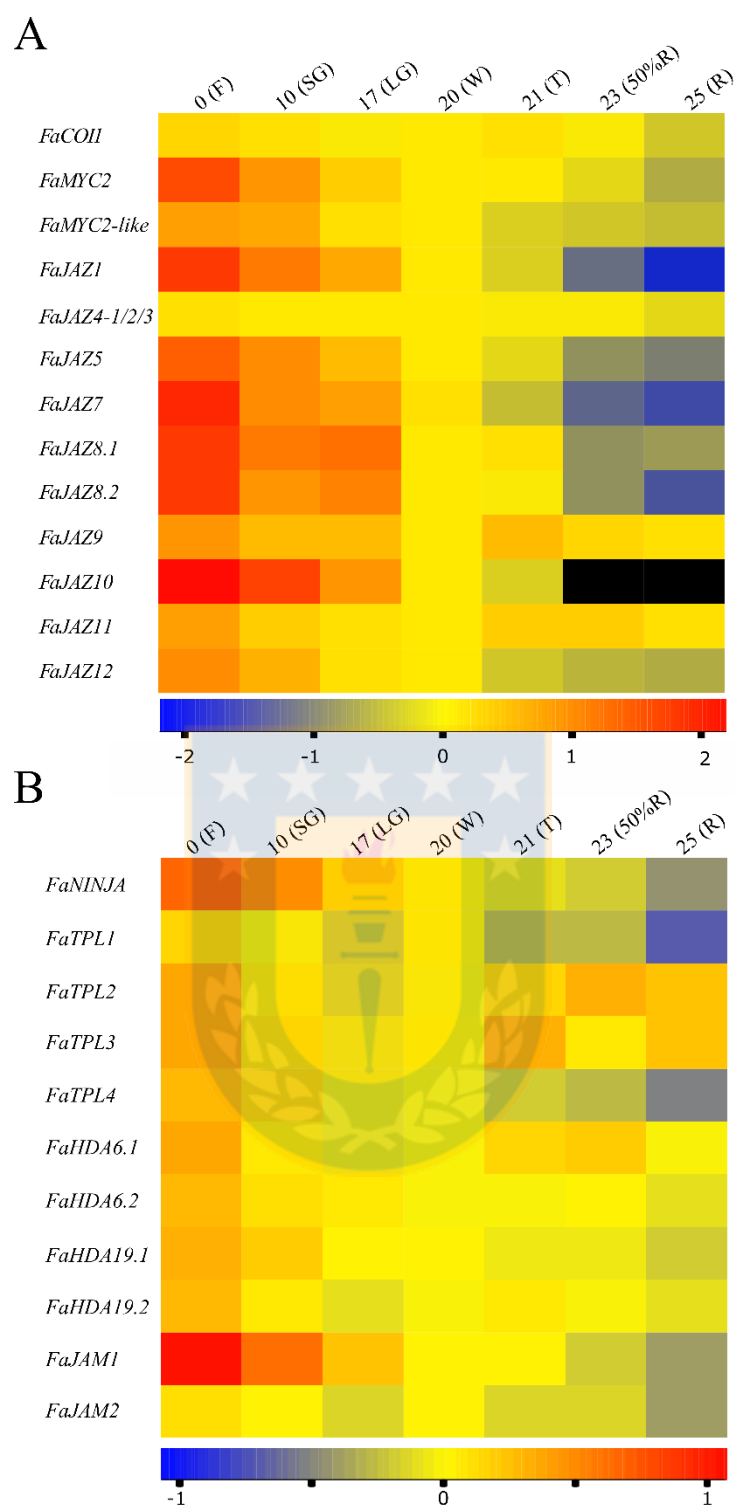


Fig. 3.7. Expression heatmaps of *Fragaria × ananassa* JA signalling-related genes during fruit development and ripening. Expression heatmaps of *FaCOII*, *FaMYCs*, *FaJAZs* (A) and *FaNINJA*, *FaTPLs*, *FaHDAs*, *FaJAMs* (B). The Log-transformed values of relative expression levels based on RT-qPCR assays were used to perform heatmaps. The color scale represents relative expression levels with red and blue colors as high and low values, respectively. Black means no detection. The expression level of *FaGAPDH* was used

as reference gene to normalize each reaction. The data was from three biological and three technical replicates. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, 100%R) days after anthesis (DAA) in *F. × ananassa* cv. Aromas. JAZ, jasmonate ZIM-Domain.

3.4.6. Expression of other JA signalling-related genes during development and ripening in *F. × ananassa* fruit.

To characterize temporal expression of additional components of the JA-related repressor machinery during *F. × ananassa* fruit development, we analyzed the expression levels of the *NINJA* adaptor-, *TPL*-, *HDA* co-repressors- and *JAM*-encoding genes (Figs. 3.7B, Table S3.7 and Table S3.8). *FaNINJA* showing a higher level at 0 and 10 DAA (F and SG stages) a then progressively declined to 25 DAA (R stage) (Fig. 3.7B and Table S3.7). During *F. × ananassa* fruit development, different expression patterns were detected for *FaTPL1*, *FaTPL2*, *FaTPL3*, *FaTPL4*, *FaHDA6.1*, *FaHDA6.2*, *FaHDA19.1* and *FaHDA19.2* (Fig. 3.7B and Table S3.7). We also observed a constant reduction of *FaJAM1* and *FaJAM2* transcript accumulation through fruit development and ripening (Fig. 3.7B) in accordance to the expression pattern of *FaMYCs* (Fig. 3.7A). Overall, *F. × ananassa* *JAZs*, *MYC2*, *MYC2-like* and other JA-signalling related genes are downregulated during fruit development and ripening.

3.4.7. Expression of *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* under JA treatment.

To gain insights into the expression response of *F. × ananassa* *JAZ* and *MYC* genes to JA treatment, we evaluated the expression profiles for *FaMYC2*, *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* in MeJA-treated W stage fruit (Fig. 3.8 and Table S3.9). We selected *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* because they showed the highest reduction in expression levels from 21 to 25 DAA (T and R stages) (Fig. 3.7A), when *F. × ananassa* (cv. Aromas) starts the anthocyanin accumulation (Fig. S3.4).

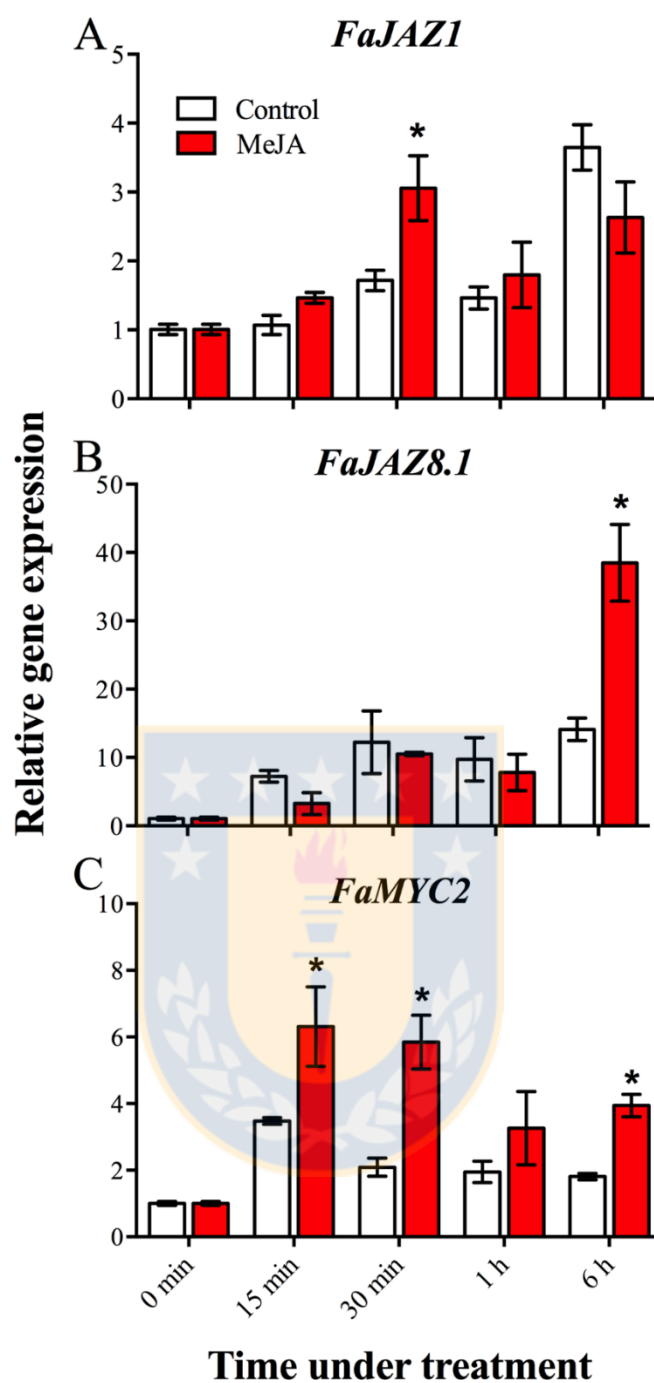


Fig. 3.8. Expression of *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* under MeJA treatment in *Fragaria × ananassa* fruit. Changes in relative expression of *FaJAZ1* (A), *FaJAZ8.1* (B) and *FaMYC2* (C) genes at 15 min, 30 min, 1 h and 6 h under 100 μ M MeJA treatment. The expression level of *FaGAPDH* was used as reference gene to normalize each reaction. The data are from three biological and three technical replicates. Data were subjected to one-way ANOVA test, differences among means \pm SE ($n = 3$) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$). JAZ, jasmonate ZIM-domain.

FaJAZ1 increased its expression 1.4-fold (p -value ≤ 0.05) respect to control after 30 min of 100 μ M MeJA application in fruit (Fig. 3.8A and Table S3.9). *FaJAZ8.1* showed an upregulation of 2.7-fold (p -value ≤ 0.05) at 6 h after MeJA treatment with respect to a control (Fig. 3.8B and Table S3.9). On the other hand, *FaMYC2* exhibited a significant upregulation of 1.8, 2.8 and 2.2-fold (p -value ≤ 0.05) at 15 min, 30 min and 6 h after MeJA treatment, respectively (Fig. 3.8C and Table S3.9). These results demonstrate that *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* are JA-responsive genes in *F. × ananassa* fruit. Moreover, *FaMYC2* responds earlier than *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* (Fig. 3.8).

3.4.8. Molecular characterization and expression of PPDs in strawberry.

To gain insights into the existence of non-JAZ TIFY proteins in strawberry, we characterized inferred amino acid sequences containing conserved domains for TIFY and Jas. In this sense, we identified two *PEAPOD* (*PPD*) genes in *F. vesca* genome using AtPPD ortholog protein sequences as queries (Table S3.1), named as *FvPPD1-1* and *FvPPD1-2* according to the gene nomenclature proposed for the Rosaceae (Jung et al., 2015). We compared exon-intron structures between *F. vesca* and *A. thaliana* *PPD* genes and observed that *FvPPD1-1* and *FvPPD1-2* have an extra intron and longer introns in comparison to those of *A. thaliana* orthologs (Panel A in Fig. S3.5). FvPPDs proteins showed conserved position of PPD, TIFY and degenerated Jas domains respect to those present in AtPPD proteins (Panel B in Fig. S3.5) along with a high identity sequence as we observed from multiple sequence alignment analysis (Panel C in Fig. S3.5). Additionally, we constructed a phylogenetic tree that showed evolutionary relationships between FvPPDs and *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* and *S. lycopersicum* orthologs (Panel D in Fig. S3.5). TIFY family was characterized in *O. sativa*, however PPDs were not reported (Ye, Du, Tang, Li, & Xiong, 2009). *FvPPD1-1* and *FvPPD1-2* were clustered along with MdPPDs and VvPPD1 in group II (Panel D in Fig. S3.5). Finally, we determined the relative expression levels of *FaPPD1-1*, displaying a decreasing pattern during fruit development and ripening (Panel E in Fig. S3.5) as we observed for most of the JA signalling-related genes in strawberry.

3.5. Discussion.

3.5.1. *FvJAZ*, *FvMYC2* and *FvMYC2-like* genes conserve synteny in *F. vesca* genome.

JAZ and MYC along with COI1 co-receptor establish the core of JA signalling pathway (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Fonseca, Chico, & Solano, 2009). Eleven to eighteen JAZ genes have been identified in the genome of higher plant species: thirteen JAZ protein members belonging to TIFY family in Arabidopsis (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Thireault et al., 2015), 15 members in rice (Ye et al., 2009), 14 members in wheat (Wang et al., 2017), 13 members in tomato (Chini, Ben-Romdhane, Hassairi, & Aboul-Soud, 2017), 18 members in apple and bamboo (Huang et al., 2016; X. Li et al., 2015) and 11 members in grape (Y. Zhang et al., 2012). We identified 12 non-redundant JAZ genes in *F. vesca* genome, *FvJAZ1*, *FvJAZ4-1*, *FvJAZ4-2*, *FvJAZ4-3*, *FvJAZ5*, *FvJAZ7*, *FvJAZ8.1*, *FvJAZ8.2*, *FvJAZ9*, *FvJAZ10*, *FvJAZ11* and *FvJAZ12* (Table 3.1). On the other hand, there are four MYC members involved in the JA signalling pathway in Arabidopsis: MYC2, MYC3, MYC4 and MYC5 (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2015). Nevertheless, we only found two genes encoding for MYC TFs in *F. vesca* genome: *MYC2* and *MYC2-like* (Table 3.1). The number of *MYC2-like* genes is variable between species, for instance *M. × domestica* contains five *MYC2-like* TFs (Table S3.2) (An et al., 2016; Li et al., 2017), but others species such as *V. vinifera*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana attenuata*, *Salvia miltiorrhiza*, and *S. lycopersicum* contain two *MYC2-like* TFs (Gupta, Prasad, & Chattopadhyay, 2014; Woldemariam et al., 2013; Zhang et al., 2012; Zhou et al., 2016) like in *F. vesca* (Table 3.1 and Table S3.2). In the case of apple, which belongs to Rosaceae family and is evolutionary related to strawberry, contains five *MYC2-like* encoding genes defined as *MdMYC2a* (An et al., 2016), *MdMYC2b*, *MdMYC2-like1*, *MdMYC2-like2* and *MdMYC2-like3* (T. Li et al., 2017).

Tandem, segmental and whole duplication are key processes in the expansion of gene families (Cannon, Mitra, Baumgarten, Young, & May, 2004; Xu, Guo, Shan, & Kong, 2012) and genome comparisons provide information about roles and evolutionary relationships between genes (Lyons et al., 2008). Tandemly duplicated genes were considered as adjacent homologous in the same chromosome according to observed in rice and apple (X. Li et al., 2015; Ye et al., 2009). Specifically, gene duplications play an important role in expansion of the TIFY family (Bai et al., 2011), to which belongs JAZ subfamily as observed for *JAZ7*, *JAZ8* and *JAZ9*, *JAZ10* in *V. vinifera* and *S. lycopersicum* genomes, respectively

(Chini et al., 2017; Zhang et al., 2012), similar to that observed in apple *JAZ* genes (Li et al., 2015). These results indicate that *FvJAZ*, *AtJAZ*, *FvMYC2* and *AtMYC2* syntenic genes share likely a common ancestor and tandemly and segmental gene duplications were important for the expansion of JAZ subfamily (Li et al., 2015). In the case of *FvPPD* genes, they did not show syntenic regions within *A. thaliana* genome.

Exon-intron organization plays a role in diversification and evolution of gene families through gain/loss and insertion/deletions (Xu et al., 2012). *FvJAZ* genes showed variable lengths and number of introns with their respective Arabidopsis orthologs (Fig. 3.2A). These differences could be a consequence of rearrangements and fusions similar to that observed in apple *TIFY* gene family (Li et al., 2015). The presence of introns allows expanding the repertoire of some JAZ proteins, as reported for the different splice variants for *AtJAZ10* with different stability in their encoded proteins and roles in JA responses (Chung & Howe, 2009). In contrast to *FvJAZ* genes, *FvMYC2* and *FvMYC2-like* genes lack introns as Arabidopsis *MYC-like* orthologs (Fig. 3.2B). In some cases, introns could have additional functions related to gene expression regulation (Chorev & Carmel, 2012), and this could be related with a key role in JAs responses (Boter, Ruíz-Rivero, Abdeen, & Prat, 2004; Dombrecht et al., 2007; Lorenzo, Chico, Sánchez-Serrano, & Solano, 2004), because their absence could be related with faster and efficient expression (Oswald & Oates, 2011).

3.5.2. *FvJAZ* proteins show conserved TIFY and Jas domains.

To gain further insights in the primary protein structure and evolutionary relationships in JAZ and MYC protein families, multiple sequence alignment and phylogenetic analyses were performed (Figs. 3.3–3.6, S2 and S3 Figs). *FvJAZ* proteins exhibited similar length and conserved structure according to that observed in Arabidopsis (Table 3.1) and previously reported in *V. vinifera* (Y. Zhang et al., 2012). Analysis of the deduced amino acid sequence of *F. vesca* JAZs showed the conservation of the TIFY/ZIM domain that characterize this family (Figs. 3.4A and 3.5A) (Bai et al., 2011; Vanholme et al., 2007) and a Jas domain (Figs. 3.4B and 3.5B), which is specific of JAZ subfamily (Bai et al., 2011; Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Pauwels & Goossens, 2011). In *F. vesca*, the TIFY domain contains the highly conserved TIFY[F/Y]XG motif (Vanholme et al., 2007) (Figs. 3.4A and 3.5A) as consensus sequence, however, some alternative sequences like TVFYXG and TIFFXG were found in *FvJAZ10* and *FvJAZ11*, respectively (Fig. 3.4A), as previously described for TIFY proteins in other species (Bai

et al., 2011). Jas domain maintained the conserved central amino acidic residues SLX₂FLXKR[K/R]X[R/E] according to consensus sequence observed in *F. vesca* (Figs. 3.4B and 3.5B) and similar to the previously reported SLX₂FX₂KRX₂R sequence in Arabidopsis (Pauwels & Goossens, 2011). Besides, FvJAZ7, FvJAZ8.1 and FvJAZ8.2 displayed a variant Jas sequence (Fig. 3.4B and Fig. S3.3) similar to that observed in Arabidopsis for JAZ7 and JAZ8 proteins (Shyu et al., 2012). Most of Arabidopsis JAZs contain a degron sequence at the Jas domain that is necessary for interaction with COI1 and JA-Ile (Sheard et al., 2010), but only FvJAZ10 showed the canonical degron LPIAR(R/K) previously described for AtJAZ1, AtJAZ2, AtJAZ10 and AtJAZ12 proteins (Shyu et al., 2012). Other FvJAZ proteins displayed variations in degron sequences such as IPMQRK in FvJAZ1 (Fig. 3.4B). Moreover, the degron sequence displayed the conserved residues R(K), and S and R (Fig. 3.4B) interacting with COI1 (Sheard et al., 2010) and MYC3 (Zhang et al., 2015), respectively. Therefore, NLS located in C-terminal region (Grunewald et al., 2009) showed amino acidic residues conserved among JAZ proteins of *F. vesca* (Figs. 3.4B and 3.5B). In some Arabidopsis JAZs, the N-terminal LxLxL type of EAR motif allows recruitment of TPL co-repressors to repress JA signalling pathway through a NINJA independent molecular mechanism (Shyu et al., 2012). In this regard, FvJAZ5 displayed the LxLxL type of EAR-motif at C-terminus, and FvJAZ7, FvJAZ8.1 and FvJAZ8.2 presented it at the N-terminus (Fig. S3.2) similar to that reported for AtJAZ5 and AtJAZ6, and AtJAZ7 and AtJAZ8 proteins, respectively (Fig. 3.3) (Shyu et al., 2012; Thatcher et al., 2016). FvJAZ5 showed the lack of DLNEPT type of EAR-motif (Panel A in Fig. S3.2) in N-terminal region previously described in AtJAZ5 and AtJAZ6 proteins (Shyu et al., 2012; Thatcher et al., 2016). Phylogenetic analysis displayed evolutionary relationships between *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera*, *S. lycopersicum* and *O. sativa* JAZ proteins (Fig. 3.6A). Protein grouping of FvJAZ proteins are related with high sequence identity respect to AtJAZ proteins (Fig. 3.3A and Table S3.4). The FvJAZ proteins clustered together with their Arabidopsis orthologs in a similar fashion than observed in several plant species (Chini et al., 2017; Li et al., 2015; Ye et al., 2009; Zhang et al., 2012), however, some phylogenetic trees contain lower bootstrap values (Zhang et al., 2012). At the same time, protein positions of FvJAZs in tree groups (Fig. 3.6A) is in agreement with the identity and synteny analyses (Fig. 3.1 and S3.1 Fig).

3.5.3. FvMYC2 and FvMYC2-like proteins showed high conservation in JID and bHLH domains.

In Arabidopsis, MYC2 (Lorenzo et al., 2004), MYC3, MYC4 (Fernández-Calvo et al., 2011; Niu, Figueroa, & Browse, 2011) and MYC5 (Figueroa & Browse, 2015) are master regulators of JA responses. We analyzed conservation domain in FvMYC2 and FvMYC2-like proteins and compared with AtMYC TFs (Fig. 3.3B and Table S3.6). The JID domain, which interacts with Jas domain to regulate JA responses (Fernández-Calvo et al., 2011; Qi et al., 2011), was present and conserved in FvMYC2 and FvMYC2-like proteins (Figs. 3.3B, 3.4C and 3.5C). Both proteins exhibited conserved bHLH domains (Figs. 3.3B, 3.4D and 3.5D), which bind to G-box *cis* elements in JA-response promoters (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012, 2015). The observed close evolutionary distances, the higher similarity in the identity matrix (Table S3.5), and similar sequence lengths and domain positions (Fig. 3.3B and Table S3.6) suggest that FvMYC2 is the ortholog TF to AtMYC2. On the other hand, FvMYC2-like is phylogenetically closer to other MYC2-like TFs such as VvMYC2-like or MdMYC2-like TFs (Fig. 3.6B). Furthermore, AtMYC3 and AtMYC4 were clustered as an independent group without ortholog sequences observed in *F. vesca* genome (Fig. 3.6B) as previously reported in *N. attenuata* and *S. miltiorrhiza*, which MYC2 has been grouped in different clusters respect to MYC3 and MYC4 proteins (Woldemariam et al., 2013; Zhou et al., 2016).

3.5.4. FaMYC2, FaJAZ1 and FaJAZ8.1 are downregulated during development and ripening in *F. × ananassa* fruit.

We analyzed the expression profiles of JAZs, MYC2, MYC2-like and other JA signalling-related genes during fruit development and ripening in *F. × ananassa*, the worldwide cultivated strawberry species. Most molecular studies on this species have been performed based on *F. vesca* reference genome (Shulaev et al., 2011) which is a subgenome of *F. × ananassa* (Liu, Poulsen, & Davis, 2016). Expression of the JA-Ile co-receptor *FaCOII* (Fig. 3.7A) was similar to that previously reported in *F. × ananassa* cv. Elsanta fruit (Preuß et al., 2014). In general, *FaJAZ* genes displayed a constant reduction pattern from flowering to ripe fruits, and some genes like *FaJAZ1*, *FaJAZ5* and *FaJAZ8.1* showed a pronounced reduction at ripe stages (Fig. 3.7A), according to proanthocyanidins (PAs) reduction and opposite to anthocyanin

accumulation during fruit development and ripening of cv. Aromas (Fig. S3.4). On the other hand, *FaJAZ10* was not detected in full ripe fruit (Fig. 3.7A). Recently, similar expression profiles for *JAZ* genes were reported for a *JAZ* gene from large green to partial red fruit stages in *F. × ananassa* cv. Hongyan (Wang et al., 2017). In this sense, Sánchez-Sevilla et al. also reported expression reduction for the most *JAZ*, named like *TIFY* genes, from RNAseq experiments in achene and receptacle during strawberry (*F. × ananassa* cv. Camarosa) fruit development and ripening (Panel A in Fig. S3.6 and Table S3.10) (Sánchez-Sevilla et al., 2017). Moreover, *FaMYC2* and *FaMYC2-like* genes exhibiting an expression reduction from flowering to ripe stages, similar to that observed for *FaJAZs* (Fig. 3.7A) and to that previously reported both in achene and receptacle (Panel A in Fig. S3.6 and Table S3.10) (Sánchez-Sevilla et al., 2017). *MYC2-like* genes have been reported in tomato and grape, although their expression patterns in fruit stages are unknown (Gupta et al., 2014; Paolacci et al., 2017). Globally, downregulation of *FaJAZs* and *FaMYC2* genes (Fig. 3.7A) matches with previously reported JA-Ile endogenous levels and expression of JA metabolism-related genes during *F. × ananassa* fruit development and ripening (Garrido-Bigotes et al., 2018). This suggests that JA metabolism and signalling are in coordination and JA pathway could have a key role in anthesis and physiological events like PAs biosynthesis that occur during early fruit development in strawberry (Fig. S3.4).

3.5.5. Other JA-signalling genes are downregulated during development and ripening of *F. × ananassa* fruits.

Other components of JA-signalling pathway like NINJA, TPLs and HDAs are key for JAs responses (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016). NINJA is necessary for transcriptional repression by interaction with JAZ proteins and the recruitment of TPL proteins (Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011). *FaNINJA* showed the same expression pattern as *FaJAZ*, *FaMYC2* and *FaMYC2-like* genes during fruit development and ripening (Fig. 3.7), like to previously observed for this gene in RNAseq assays (Panel B in Fig. S3.6 and Table S3.10) (Sánchez-Sevilla et al., 2017). Otherwise, different patterns of expression were detected for *TPL* genes (Fig. 3.7B) and these patterns were similar to those reported for *TPL* genes in *S. lycopersicum* fruit (Hao et al., 2014). However, *TPL* gene expression seems to depend of the fruit tissue (Panel B in Fig. S3.6 and Table S3.10) (Sánchez-Sevilla et al., 2017). Moreover, HDAs are recruited by TPLs during JAZ-mediated transcriptional repression (Pérez & Goossens, 2013),

and *FaHDA6* and *FaHDA19* expression levels were similar to *FaTPL* genes (Fig. 3.7B), suggesting a possible transcriptional coordination between both gene families. Finally, *FaJAM1* and *FaJAM2* exhibited a reduction expression during fruit development and ripening (Fig. 3.7B), according to observed for *FaMYC2* and *FvMYC2-like* genes (Fig. 3.7A) and expression levels previously reported for *F. × ananassa JAM1* and *JAM2* genes in receptacle by RNAseq assays (Panel B in Fig. S3.6 and Table S3.10) (Sánchez-Sevilla et al., 2017). This fact is related with the antagonistic effect of JAMs on MYC2 TFs and the negative regulation of JA responses (Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013). These results indicate that JA signalling pathway is turned off during development and ripening of *F. × ananassa* fruit according to the reduction of JA-Ile endogenous levels (Garrido-Bigotes et al., 2018).

3.5.6. *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* are JA-responsive genes in *F. × ananassa* fruit.

JAZ and *MYC2* genes are JA-responsive genes in Arabidopsis leaves (Pauwels et al., 2010). We evaluated *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* expression under 6 h of MeJA treatment. We selected *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* because they showed the highest reduction in expression levels from turning to ripe stages (Fig. 3.7A), when *F. × ananassa* cv. Aromas starts the anthocyanin accumulation (Fig. S3.4). These genes also showed an expression pattern concomitant with the PAs accumulation pattern of developing fruit (Fig. S3.4). Moreover, we selected *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* since their deduced amino acid sequences are structurally different: *FaJAZ1* contains a variation of the canonical degron sequence (IPMQRK) in contrast to *FaJAZ8.1*, which lacks canonical degron (Fig. 3.4B) as well as *AtJAZ8* (Shyu et al., 2012). *FaJAZ1* raised its expression levels after 30 min under MeJA treatment in fruit at white stage (Fig. 3.8A), according to the previously observed with the ortholog genes in Arabidopsis leaves (Pauwels et al., 2010). *FaJAZ8.1* displayed an increase of expression at 6 h after MeJA treatment, later than *FaJAZ1* (Fig. 3.8B). On the other hand, *FaMYC2* showed higher expression levels at 15, 30 min and 6 h after MeJA application (Fig. 3.8C), similar to observed for *AtMYC2* expression in Arabidopsis leaves (Pauwels et al., 2010). In summary, *FaMYC2* responds earlier than *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* (Fig. 3.8) suggesting a previous transcriptional activation according to the master role in JA responses regulation (Chini et al., 2007; Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016). Furthermore, the early induction

of *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* and *FaMYC2* genes could be related with JA-Ile accumulation under JA treatment, as previously reported (Garrido-Bigotes et al., 2018).

3.6. Conclusions.

Overall, we identified and characterized 12 *JAZ* and two *MYC* genes in *F. vesca* genome, encoding for key components in the regulation of JA responses in plants (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Fonseca et al., 2009). Nevertheless, the number of *JAZ* and *MYC* genes could be higher to that reported in the present research, since *F. × ananassa* is an octoploid and hybrid species (Liu et al., 2016), similar to the findings reported for the triploid *M. × domestica* species (Li et al., 2015). Synteny analysis using Arabidopsis genome and exon-intron organization indicates that *FvJAZ* subfamily and *FvMYC2-like* genes have a common ancestor with Arabidopsis. Besides, protein sequences are highly conserved through domains and position into *JAZ* and *MYC2-like* proteins. Finally, we evaluated temporal expression pattern of key JA signalling components during development and ripening of *F. × ananassa* fruit, indicating that JA signalling pathway is downregulated along with PAs decrease accumulation during fruit development and ripening processes in agreement with previously reported temporal JA-Ile reduction (Garrido-Bigotes et al., 2018). In addition, we demonstrated that *FaMYC2*, *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* are JA-responsive genes in *F. × ananassa* fruit which could related with the activation of JA-Ile biosynthesis detected in MeJA-treated fruit recently reported (Garrido-Bigotes et al., 2018).

The JA signalling pathway could trigger PAs biosynthesis at early stages of strawberry fruit development, which shows a similar reduction profile with JA pathway during development and ripening. Thus, the present research opens the gates to further studies to decipher specific JA-Ile roles and its signalling pathway-associated components during early development of strawberry and other non-climacteric fruits.

3.7. Acknowledgments.

We thankfully acknowledge Dr. Andrea Chini (Department of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid, Spain) for his critical reading and important suggestions on this manuscript.

3.8. References.

- Ahmad, P., Rasool, S., Gul, A., Sheikh, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., ... Gucl, S. (2016). Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00813>
- An, J.-P., Li, H.-H., Song, L.-Q., Su, L., Liu, X., You, C.-X., ... Hao, Y.-J. (2016). The molecular cloning and functional characterization of MdMYC2, a bHLH transcription factor in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.032>
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W147-153. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., & Chen, M. (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, 98(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.05.002>
- Boter, M., Ruíz-Rivero, O., Abdeen, A., & Prat, S. (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes & Development*, 18(13), 1577-1591. <https://doi.org/10.1101/gad.297704>
- Böttcher, C., Burbidge, C. A., di Rienzo, V., Boss, P. K., & Davies, C. (2015). Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(7), 618-627. <https://doi.org/10.1111/jipb.12321>
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 4, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-10>
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., ... Li, C. (2012). The Arabidopsis Mediator Subunit MED25 Differentially Regulates Jasmonate and Abscisic Acid Signaling through Interacting with the MYC2 and ABI5 Transcription Factors. *The Plant Cell Online*, tpc.112.098277. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098277>
- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. (2014). «Movers and shakers» in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4705-4722. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru280>

- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Ben-Romdhane, W., Hassairi, A., & Aboul-Soud, M. A. M. (2017). Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PLOS ONE*, *12*(6), e0177381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177381>
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., & Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *59*(1), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03852.x>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Chorev, M., & Carmel, L. (2012). The Function of Introns. *Frontiers in Genetics*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00055>
- Chung, H. S., & Howe, G. A. (2009). A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(1), 131-145. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064097>
- Chung, H. S., Koo, A. J. K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, *146*(3), 952-964. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115691>
- Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, *70*, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, *14*(6), 1188-1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in

- Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2225-2245. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048017>
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701-715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Figueroa, P., & Browse, J. (2012). The Arabidopsis JAZ2 promoter contains a G-Box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins. *Plant & Cell Physiology*, 53(2), 330-343. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr178>
- Figueroa, P., & Browse, J. (2015). Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 81(6), 849-860. <https://doi.org/10.1111/tpj.12776>
- Fonseca, S., Chico, J. M., & Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 539-547. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.013>
- Fonseca, S., Fernández-Calvo, P., Fernández, G. M., Díez-Díaz, M., Gimenez-Ibanez, S., López-Vidriero, I., ... Solano, R. (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 Are New Targets of JAZ Repressors Negatively Regulating JA Responses. *PLOS ONE*, 9(1), e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9608940>
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(1), 101-113. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9710-x>
- Gasic, K., Hernandez, A., & Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 437-438. <https://doi.org/10.1007/BF02772687>
- Geyter, N. D., Gholami, A., Goormachtig, S., & Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17(6), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>

- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G., & Goossens, A. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Reports*, *10*(8), 923-928. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.103>
- Gupta, N., Prasad, V. B. R., & Chattopadhyay, S. (2014). LeMYC2 acts as a negative regulator of blue light mediated photomorphogenic growth, and promotes the growth of adult tomato plants. *BMC Plant Biology*, *14*, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-38>
- Hao, Y., Wang, X., Li, X., Bassa, C., Mila, I., Audran, C., ... Zouine, M. (2014). Genome-wide identification, phylogenetic analysis, expression profiling, and protein-protein interaction properties of TOPLESS gene family members in tomato. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1013-1023. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert440>
- He, Z., Zhang, H., Gao, S., Lercher, M. J., Chen, W.-H., & Hu, S. (2016). Evolview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, *44*(Web Server issue), W236-W241. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw370>
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDD 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, *31*(8), 1296-1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- Huang, Z., Jin, S.-H., Guo, H.-D., Zhong, X.-J., He, J., Li, X., ... Chen, Q.-B. (2016). Genome-wide identification and characterization of TIFY family genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses. *PeerJ*, *4*, e2620. <https://doi.org/10.7717/peerj.2620>
- Jung, S., Bassett, C., Bielenberg, D. G., Cheng, C.-H., Dardick, C., Main, D., ... Schaffer, R. J. (2015). A standard nomenclature for gene designation in the Rosaceae. *Tree Genetics & Genomes*, *11*(5), 108. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0931-5>
- Lee, T.-H., Tang, H., Wang, X., & Paterson, A. H. (2013). PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D1152-D1158. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1104>

- Li, T., Xu, Y., Zhang, L., Ji, Y., Tan, D., Yuan, H., & Wang, A. (2017). The Jasmonate-Activated Transcription Factor MdMYC2 Regulates ETHYLENE RESPONSE FACTOR and Ethylene Biosynthetic Genes to Promote Ethylene Biosynthesis during Apple Fruit Ripening. *The Plant Cell Online*, tpc.00349.2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00349>
- Li, X., Yin, X., Wang, H., Li, J., Guo, C., Gao, H., ... Wang, X. (2015). Genome-wide identification and analysis of the apple (*Malus × domestica* Borkh.) TIFY gene family. *Tree Genetics & Genomes*, 11(1), 808. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0808-z>
- Liu, B., Poulsen, E. G., & Davis, T. M. (2016). Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids. *Genome*, 59(2), 79-86. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0116>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 16(7), 1938-1950. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
- Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J., Alam, M., Ming, R., Tang, H., ... Freeling, M. (2008). Finding and Comparing Syntenic Regions among Arabidopsis and the Outgroups Papaya, Poplar, and Grape: CoGe with Rosids. *Plant Physiology*, 148(4), 1772-1781. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124867>
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A. J. K., Moreno, J. E., Suzuki, K., ... Ohme-Takagi, M. (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(5), 1641-1656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>
- Niu, Y., Figueroa, P., & Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, erq408. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq408>
- Oswald, A., & Oates, A. C. (2011). Control of endogenous gene expression timing by introns. *Genome Biology*, 12(3), 107. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-107>

- Paolacci, A. R., Catarcione, G., Ederli, L., Zadra, C., Pasqualini, S., Badiani, M., ... Ciaffi, M. (2017). Jasmonate-mediated defence responses, unlike salicylate-mediated responses, are involved in the recovery of grapevine from bois noir disease. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1069-4>
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, *23*(9), 3089-3100. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089300>
- Pérez, A. C., & Goossens, A. (2013). Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant, Cell & Environment*, *36*(12), 2071-2084. <https://doi.org/10.1111/pce.12121>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.004>
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., & Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(9), 1473-1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., ... 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>
- Sánchez-Sevilla, J. F., Vallarino, J. G., Osorio, S., Bombarely, A., Posé, D., Merchante, C., ... 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14239-6>
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., ... Shirasu, K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of

- jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(1), 291-304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., ... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., ... Folta, K. M. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43(2), 109-116. <https://doi.org/10.1038/ng.740>
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C. L., Cooke, T. F., Sheard, L. B., Moreno, J. E., ... Howe, G. A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 536-550. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093005>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1079, 105-116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Thatcher, L. F., Cevik, V., Grant, M., Zhai, B., Jones, J. D. G., Manners, J. M., & Kazan, K. (2016). Characterization of a JAZ7 activation-tagged Arabidopsis mutant with increased susceptibility to the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2367-2386. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw040>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 82(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/tpj.12841>
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science*, 12(6), 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.004>
- Wang, Q.-H., Zhao, C., Zhang, M., Li, Y.-Z., Shen, Y.-Y., & Guo, J.-X. (2017). Transcriptome analysis around the onset of strawberry fruit ripening uncovers an

- important role of oxidative phosphorylation in ripening. *Scientific Reports*, 7, 41477. <https://doi.org/10.1038/srep41477>
- Wang, Y., Qiao, L., Bai, J., Wang, P., Duan, W., Yuan, S., ... Zhao, C. (2017). Genome-wide characterization of JASMONATE-ZIM DOMAIN transcription repressors in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 18(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3582-0>
- 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, C., & Feussner, I. (2018). The Oxylinin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), null. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040440>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* (Oxford, England), 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- White, D. W. R. (2006). PEAPOD regulates lamina size and curvature in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13238-13243. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604349103>
- Woldemariam, M. G., Dinh, S. T., Oh, Y., Gaquerel, E., Baldwin, I. T., & Galis, I. (2013). NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biology*, 13, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-73>
- Xu, G., Guo, C., Shan, H., & Kong, H. (2012). Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1187-1192. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109047109>
- Ye, H., Du, H., Tang, N., Li, X., & Xiong, L. (2009). Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice. *Plant Molecular Biology*, 71(3), 291-305. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9524-8>
- Zhang, F., Yao, J., Ke, J., Zhang, L., Lam, V. Q., Xin, X.-F., ... He, S. Y. (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signaling. *Nature*, 525(7568), 269-273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>

- Zhang, Y., Gao, M., Singer, S. D., Fei, Z., Wang, H., & Wang, X. (2012). Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. *PloS One*, 7(9), e44465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044465>
- Zhou, Y., Sun, W., Chen, J., Tan, H., Xiao, Y., Li, Q., ... Chen, W. (2016). SmMYC2a and SmMYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Scientific Reports*, 6, 22852. <https://doi.org/10.1038/srep22852>



3.9. Supplementary Material.

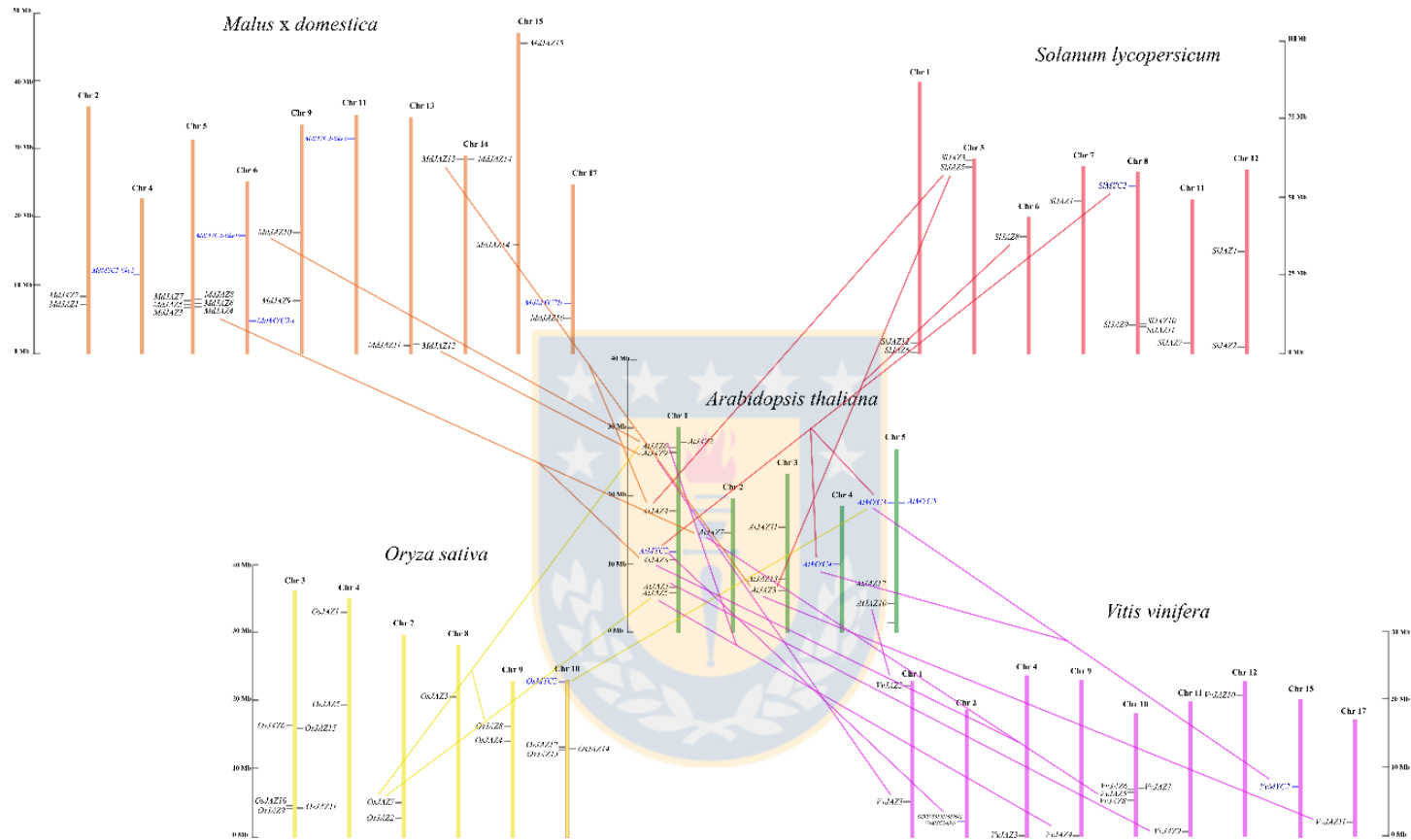


Fig. S3.1. Synteny analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Malus x domestica*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* and *Oryza sativa* JAZ and MYC genes. Grey and blue horizontal lines indicate position of JAZ and MYC-like genes along chromosome, respectively. Orange, pink, purple and yellow lines indicate syntenic regions between *A. thaliana* and *M. x domestica*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera* and *O. sativa* JAZ and MYC-like genes, respectively.

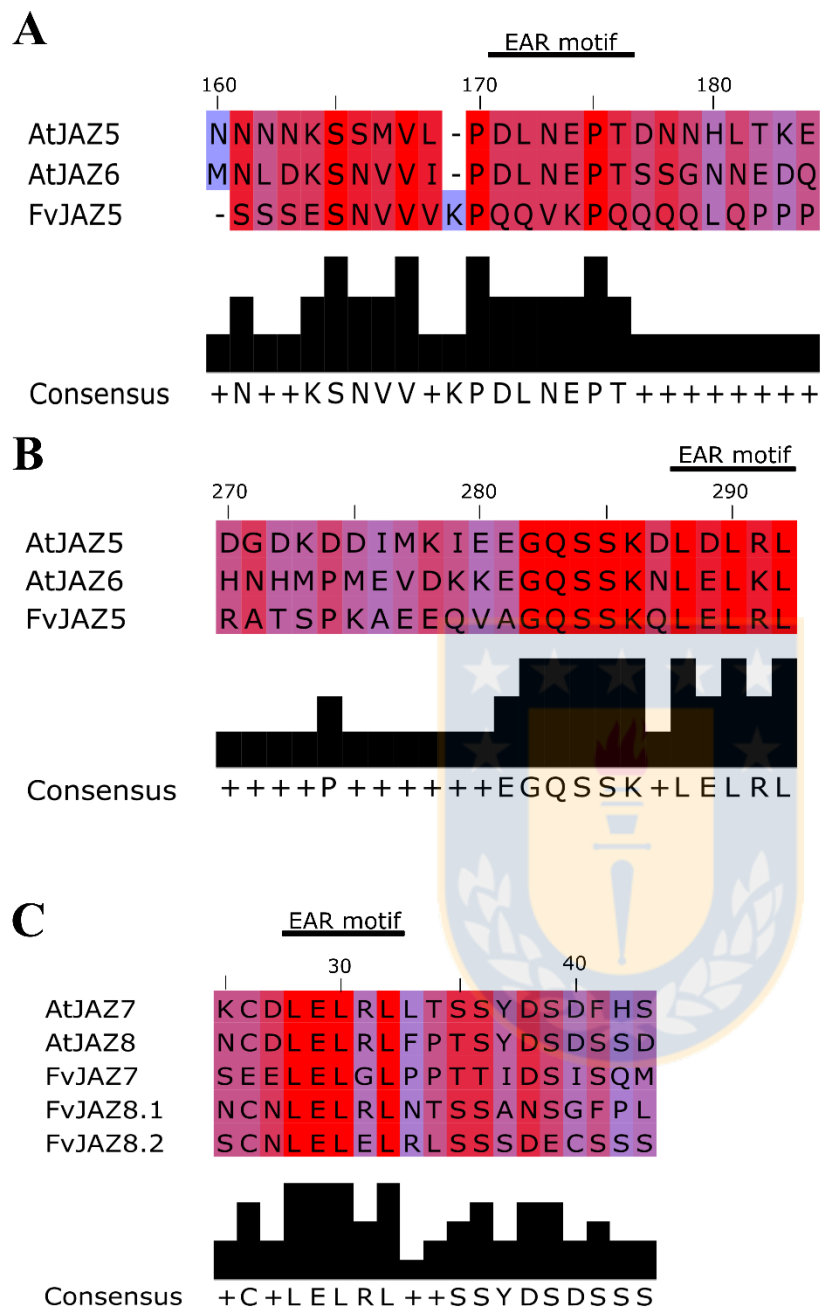


Fig. S3.2. EAR motifs in *Fragaria vesca* (Fv) y *Arabidopsis thaliana* (At) JAZ proteins. DLNPT (A) and EAR LxLxL (B) motifs of AtJAZ5, AtJAZ6, FvJAZ5, and EAR LxLxL motif of AtJAZ7, AtJAZ8, FvJAZ7, FvJAZ8.1 and FvJAZ8.2 (C). Red and blue colors indicate higher and lower amino acidic residues conservation, respectively. EAR, ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression domain; JAZ, jasmonate ZIM-domain.

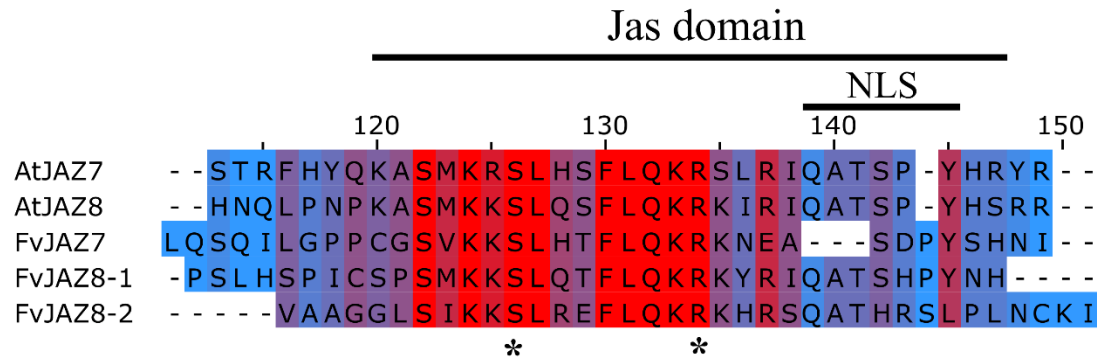


Fig. S3.3. Multiple sequences alignment of degenerate Jas domain in *Arabidopsis thaliana* (At) and *Fragaria vesca* (Fv) JAZ7 and JAZ8 proteins. Asterisks (*) indicate conserved residues involved for JAZ-MYC interaction (Zhang et al. 2015). Red and blue colors indicate higher and lower amino acidic residues conservation, respectively. JAZ, jasmonate ZIMdomain; NLS, nuclear localization signalling.



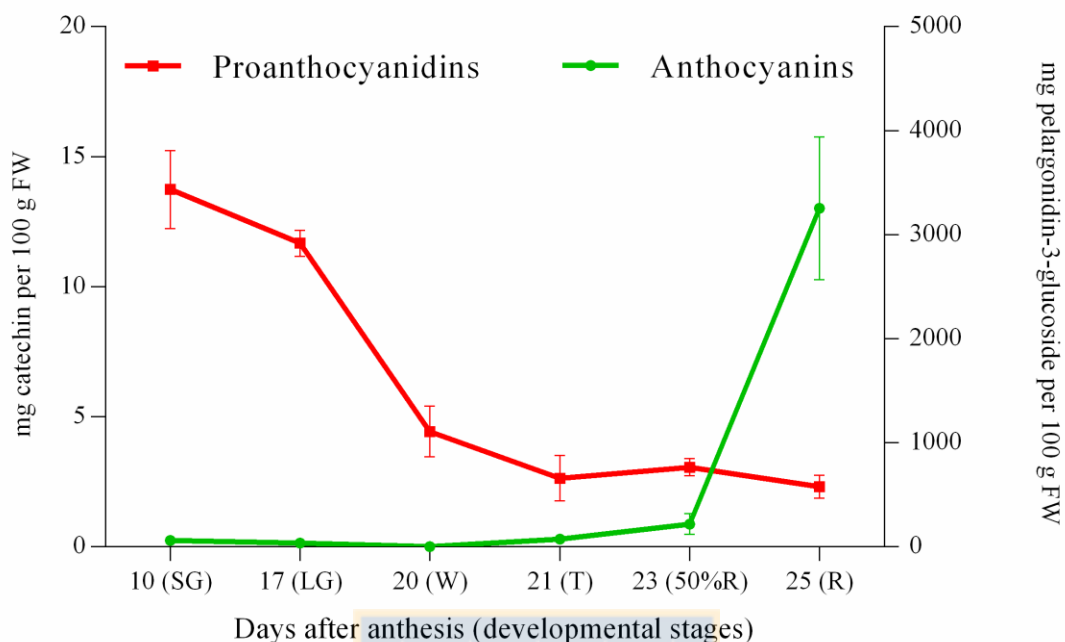


Fig. S3.4. Proanthocyanidins (PAs) and anthocyanins contents during development and ripening of *Fragaria* × *ananassa* (cv. Aromas) fruit. Data are from three biological and three technical replicates. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R) and 25 (100% red receptacle, 100%R) days after anthesis (DAA) in *F. × ananassa* cv. Aromas fruit. Data were analysed by one-way ANOVA test, and differences among means ± SE (n = 3) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$) for each gene.

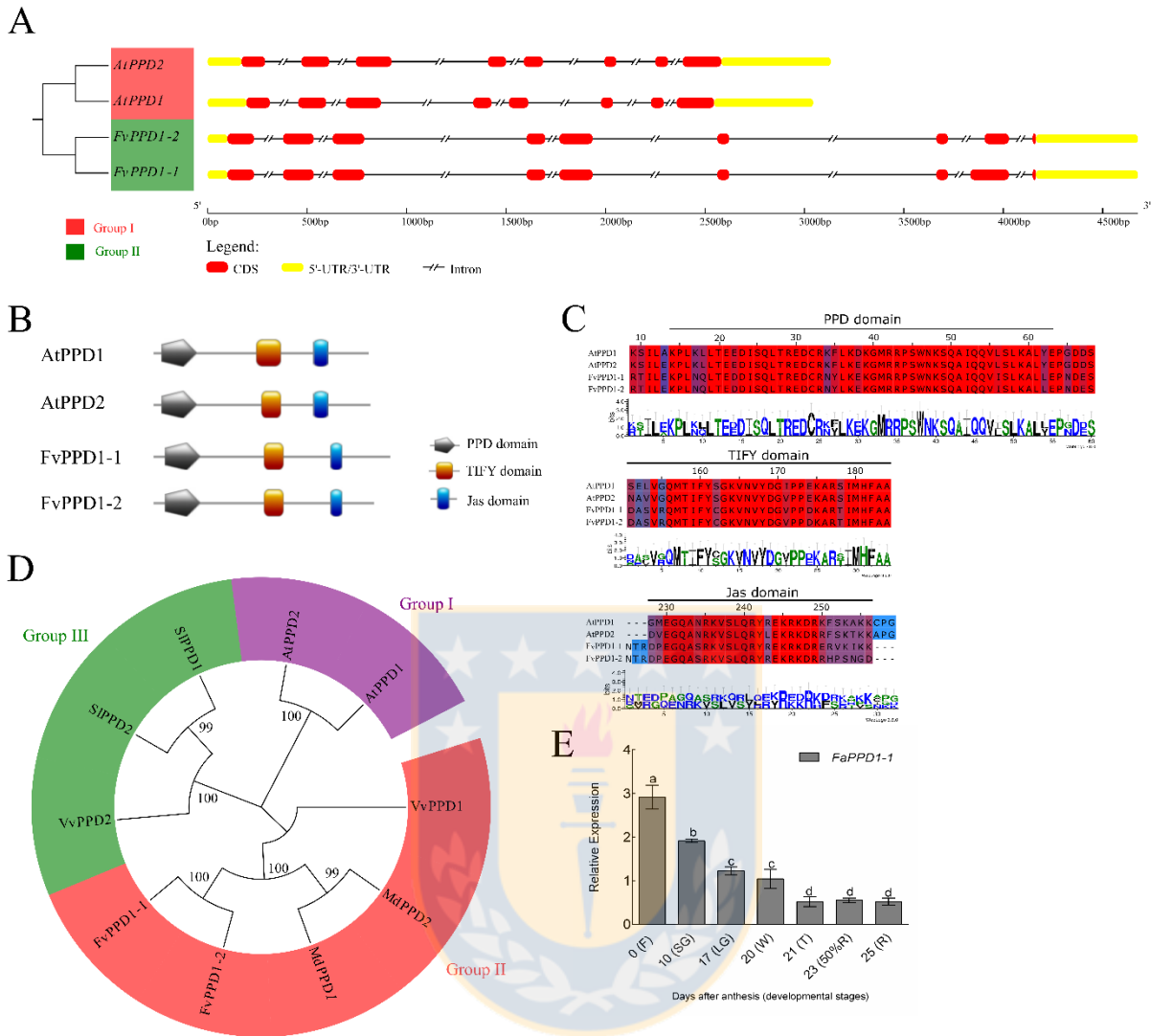


Fig. S3.5. Molecular characterization of PEAPOD (PPDs) protein subfamily in *Fragaria vesca* and *Fragaria × ananassa*. Exon-intron organization of *Arabidopsis thaliana* (At) and *F. vesca* (Fv) PPD genes (A). Yellow and red bars indicate UTR regions and exons, respectively. Black interrupted lines indicate introns. Domain structure of *A. thaliana* and *F. vesca* PPD proteins (B). The relative position of each domain within each protein are displayed in colors. Multiple alignment sequences of *A. thaliana* and *F. vesca* PPD proteins (C). Red and blue colors indicate higher and lower amino acidic residues conservation, respectively. Phylogenetic analysis between PPDs proteins of *A. thaliana*, *F. vesca*, *M. × domestica*, *V. vinifera* and *S. lycopersicum* (D). The phylogenetic analysis was performed using full-length JAZ and MYC protein sequences. Nodes with bootstrap values > 70% are labelled and bootstrap values > 95% show highlight bootstrap. Relative gene expression of *F. × ananassa PPD1-1* during fruit development and ripening of *F. ×*

ananassa cv. Aromas (E). Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R), and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test, and differences among means \pm SE ($n = 3$) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$).



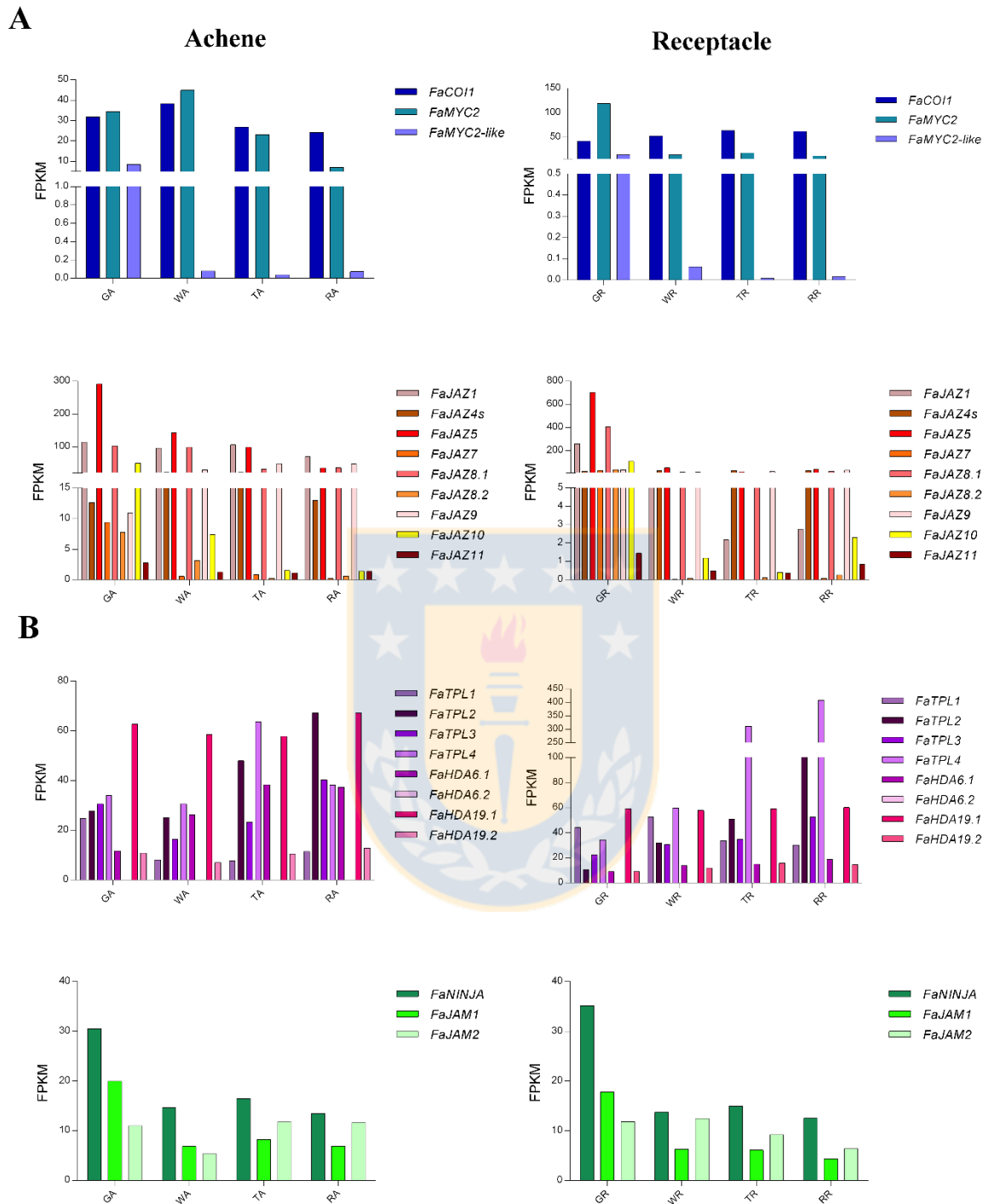


Fig. S3.6. Expression patterns of JA signalling-related genes in achene and receptacle during development and ripening of *Fragaria × ananassa* (cv. Camarosa) fruit from FPKM values obtained from RNAseq experiments (Sanchez-Sevilla et al. 2017; see Table S3.10). Gene expression patterns of *FaCOI1*, *FaMYCs*, *FaJAZs* (A) and *FaNINJA*, *FaJAMs*, *FaTPLs*, *FaHDAs* (B). Expression data were extracted from accession numbers of *F. vesca* (Sanchez-Sevilla et al.

2017) and we renamed according to the present research gene nomenclature. *FaJAZ12* gene was not found in RNAseq experiments from Sanchez-Sevilla et al. (2017). Developmental stages correspond to GA (green achene), GR (green receptacle), RA (ripe achene), RR (ripe receptacle), TA (turning achene), TR (turning receptacle), WA (white achene), WR (white receptacle). COI1, coronatine insensitive 1; HDA, histone deacetylase; JAM, jasmonate-associated MYC2-like; JAZ, jasmonate-ZIM-domain; NINJA, novel interactor of JAZ; TPL, TOPLESS.



Table S3.1. Predicted mRNA sequences of *Fragaria vesca* using JA signalling-related protein sequences of *Arabidopsis* as queries and Refseq-rna database of *F. vesca* as subject. HDA, Histone deacetylases; JAM, Jasmonate-Associated MYC2-like; JAZ, Jasmonate-ZIM-domain; NINJA, Novel Interactor of JAZ; TPL, TOPLESS, PPD, PEAPOD.

<i>A. thaliana - N. attenuata</i>		Tblastn				<i>Fragaria vesca</i>		
Protein	Accession	Score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	Predicted mRNA	Accession	Name ¹
AtJAZ1	NP_564075	127	99	2e-33	36	TIFY 10A (LOC101302102)	XM_004287607	JAZ1/TIFY10a
		107	60	2e-16	37	TIFY 11A-like (LOC101305492)	XM_004303663	JAZ5/TFY11a
AtJAZ2	NP_565096	122	93	2e-31	34	TIFY 10A (LOC101302102)	XM_004287607	JAZ1/TIFY10a
		191	95	1e-54	42	TIFY 6B (LOC101303423)	XM_004299468	JAZ9/TIFY6b
AtJAZ3	NP_566590	156	94	3e-42	38	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X3	XM_011464880	JAZ4-3/TIFY6b
		146	94	2e-38	35	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X2	XM_011464878	JAZ4-2/TIFY6b
		145	94	3e-38	35	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X1	XM_004297401	JAZ34-1/TIFY6b
AtJAZ4	NP_001117450	138	99	1e-36	35	TIFY 6B (LOC101303423)	XM_004299468	JAZ9/TIFY6b
		127	99	1e-32	35	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X3	XM_011464880	JAZ4-3/TIFY6b
		127	99	3e-30	34	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X2	XM_011464878	JAZ4-2/TIFY6b
		120	99	4e-30	34	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X1	XM_004297401	JAZ4-1/TIFY6b
AtJAZ5	NP_564019	75.5	75	4e-15	28	TIFY 10A-like (LOC101302102)	XM_004287607	JAZ1/TIFY10a
		68.6	77	7e-13	31	TIFY 11A-like (LOC101305492)	XM_004303663	JAZ5/TFY11a
AtJAZ6	NP_565043	74.7	78	8e-15	26	TIFY 10A-like (LOC101302102)	XM_004287607	JAZ1/TIFY10a
		100	68	9e-12	33	TIFY 11A-like (LOC101305492)	XM_004303663	JAZ5/TFY11a
AtJAZ7	NP_181007	68.9	85	3e-14	41	TIFY 5A-like (LOC101295112)	XM_004293578	JAZ8.1/TIFY5a
		42.4	56	6e-05	35	TIFY 5B (LOC105352369)	XM_011469361	JAZ7/TIFY5b
AtJAZ8	NP_564349	79.3	96	4e-18	43	TIFY 5A-like (LOC101295112)	XM_004293578	JAZ8.1/TIFY5a
		94.4	98	3e-21	29	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X3	XM_011464880	JAZ4-3/TIFY6b
AtJAZ9	NP_177227	86.6	91	2e-19	31	TIFY 6B (LOC101303423)	XM_004299468	JAZ9/TIFY6b
		82.8	98	2e-17	28	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X2	XM_011464878	JAZ4-2/TIFY6b
		82.4	98	3e-17	28	TIFY 6B (LOC101298700), transcript variant X1	XM_004297401	JAZ4-1/TIFY6b

AtJAZ10	NP_001154713	58.2	78	6e-10	32	TIFY 9-like (LOC101299545)	XM_004310081	<i>JAZ10/TIFY9</i>
		137	78	1e-15	38	TIFY 3A-like (LOC105349490)	XM_011459279	<i>JAZ11/TIFY3a</i>
AtJAZ11	NP_189930	122	75	4e-13	40	TIFY 3B (LOC101312185)	XM_004287641	<i>JAZ12/TIFY3b</i>
		53.5	41	7e-08	35	TIFY 9-like (LOC101299545)	XM_004310081	<i>JAZ10/TIFY9</i>
		47	77	8e-06	25	TIFY 6B (LOC101303423)	XM_011464880	<i>JAZ9/TIFY6b</i>
		102	61	1e-25	48	TIFY 3B-like (LOC101312185)	XM_004287641	<i>JAZ12/TIFY3b</i>
AtJAZ12	NP_197590	78.2	57	2e-17	41	TIFY 3A-like (LOC105349490)	XM_011459279	<i>JAZ11/TIFY3a</i>
		68.6	65	2e-13	30	TIFY 10A-like (LOC101302102)	XM_004287607	<i>JAZ1/TIFY10a</i>
		56.2	58	3e-09	36	TIFY 9-like (LOC101299545)	XM_004310081	<i>JAZ10/TIFY9</i>
		50.1	81	6e-08	32	TIFY 5B (LOC105352369)	XM_011469361	<i>JAZ7/TIFY5b</i>
AtJAZ13	NP_001078200	50.1	81	6e-08	32	TIFY 5B (LOC105352369)	XM_011469361	<i>JAZ7/TIFY5b</i>
AtNINJA	NP_849467	327	89	5e-95	45	Ninja-family protein mc410-like (LOC101314595)	XM_004287404	<i>NINJA</i>
		2004	100	0.0	81	TOPLESS-like (LOC101309271)	XM_004303220	<i>TPL1</i>
		1653	97	0.0	68	Topless-related protein 4-like (LOC101312083)	XM_004287239	<i>TPL2</i>
		1491	98	0.0	63	TOPLESS-like (LOC101312083)	XM_004307834	<i>TPL3</i>
		1391	99	0.0	60	Topless-related protein 2-like (LOC101296764)	XM_004296832	<i>TPL4</i>
AtHDA6	ACA97993	765	93	0.0	81	histone deacetylase 6-like (LOC101309835)	XM_004299084	<i>HDA6.1</i>
		651	87	0.0	71	histone deacetylase 6-like (LOC101314516)	XM_004289555	<i>HDA6.2</i>
AtHDA19	NP_195526	838	97	0.0	83	histone deacetylase 19-like (LOC101311924)	XM_004290052	<i>HDA19.1</i>
		531	79	3e-169	59	histone deacetylase 19-like (LOC101296668)	XM_004299996	<i>HDA19.2</i>
AtMYC2	NP_174541	584	100	0.0	49	transcription factor MYC2-like (LOC101308180)	XM_004300191	<i>MYC2</i>
		347	59	1e-54	53	transcription factor MYC2-like (LOC101299702)	XM_004306579	<i>MYC2-like</i>
AtMYC3	NP_19448	530	80	6e-83	59	transcription factor MYC2-like (LOC101308180)	XM_004300191	<i>MYC2</i>
		297	61	3e-45	47	transcription factor MYC2-like (LOC101299702)	XM_004306579	<i>MYC2-like</i>
AtMYC4	NP_193522	550	87	3e-90	62	transcription factor MYC2-like (LOC101308180)	XM_004300191	<i>MYC2</i>
		293	59	1e-44	47	transcription factor MYC2-like (LOC101299702)	XM_004306579	<i>MYC2-like</i>
AtMYC5		352	72	7e-51	56	transcription factor MYC2-like (LOC101308180)	XM_004300191	<i>MYC2</i>

	NP_199495	239	93	6e-70	34	transcription factor MYC2-like (LOC101299702)	XM_004306579	<i>MYC2-like</i>
AtJAM1	NP_566078	489	94	2e-163	48	transcription factor bHLH13-like (LOC101309083)	XM_004306609	<i>JAM1</i>
		330	96	1e-101	38	transcription factor bHLH3-like (LOC101302795)	XM_011459681	<i>JAM2</i>
AtJAM2	NP_171634	510	99	5e-171	47	transcription factor bHLH13-like (LOC101309083)	XM_004306609	<i>JAM1</i>
		327	71	5e-44	38	transcription factor bHLH3-like (LOC101302795)	XM_011459681	<i>JAM2</i>
AtJAM3	NP_193376	505	100	3e-170	53	transcription factor bHLH3-like (LOC101302795)	XM_011459681	<i>JAM2</i>
		340	93	3e-53	52	transcription factor bHLH13-like (LOC101309083)	XM_004306609	<i>JAM1</i>
AtPPD1	NP_567442	184	996	2e-53	40	TIFY 4B-like (LOC101296196), transcript variant X1	XM_004296526	<i>FvPPD1-1/TIFY4B</i>
		177	74	3e-51	43	TIFY 4B-like (LOC101296196), transcript variant X2	XM_011464153	<i>FvPPD1-2/TIFY4B</i>
AtPPD2	NP_193208	204	94	3e-61	42	TIFY 4B-like (LOC101296196), transcript variant X1	XM_004296526	<i>FvPPD1-1/TIFY4B</i>
		191	76	1e-56	44	TIFY 4B-like (LOC101296196), transcript variant X2	XM_011464153	<i>FvPPD1-2/TIFY4B</i>

¹This refers to the gene names assigned in the present research.

Table S3.2. Genomic information of JAZ and MYC genes of *Arabidopsis thaliana*, *Fragaria vesca*, *Malus × domestica*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* and *Oryza sativa* used for synteny analysis. JAZ, Jasmonate ZIM-domain.

Species	Gene	Accession	Database ¹	Chromosome	Start	End
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>JAZ1</i>	AT1G19180	TAIR	1	6621777	6623620
	<i>JAZ2</i>	AT1G74950	TAIR	1	28148575	28150446
	<i>JAZ3</i>	AT3G17860	TAIR	3	6119707	6123044
	<i>JAZ4</i>	AT1G48500	TAIR	1	17931390	17934662
	<i>JAZ5</i>	AT1G17380	TAIR	1	5955155	5957511
	<i>JAZ6</i>	AT1G72450	TAIR	1	27273968	27276562
	<i>JAZ7</i>	AT2G34600	TAIR	2	14573030	14573952
	<i>JAZ8</i>	AT1G30135	TAIR	1	10596352	10597341
	<i>JAZ9</i>	AT1G70700	TAIR	1	26654529	26657350
	<i>JAZ10</i>	AT5G13220	TAIR	5	4218786	4221077
	<i>JAZ11</i>	AT3G43440	TAIR	3	15367546	15370157
	<i>JAZ12</i>	AT5G20900	TAIR	5	7090704	7092539
	<i>JAZ13</i>	AT3G22275	TAIR	3	7878807	7879810
	<i>MYC2</i>	AT1G32640	TAIR	1	11798119	11801407
	<i>MYC3</i>	AT5G46760	TAIR	5	18974022	18976590
<i>MYC4</i>	AT4G17880	TAIR	4	9933326	9935685	
<i>MYC5</i>	AT5G46830	TAIR	5	19002564	19004384	
<i>Fragaria vesca</i>	<i>JAZ1</i>	XM_004287607	NCBI	1	6964291	6965689
	<i>JAZ4-1/2/3</i>	XM_004297401/ XM_011464878/ XM_011464880	NCBI	4	19330995	19333777
	<i>JAZ5</i>	XM_004303663	NCBI	6	24774113	24774773
	<i>JAZ7</i>	XM_011469361	NCBI	6	27798266	27799489
	<i>JAZ8.1</i>	XM_004293578	NCBI	3	2612521	2613468
	<i>JAZ8.2</i>	XM_011461905	NCBI	3	2616234	2616765
	<i>JAZ9</i>	XM_004299468	NCBI	5	9961254	9964696
	<i>JAZ10</i>	XM_004310081	NCBI	1	1660803	1661807
<i>JAZ11</i>	XM_011459279	NCBI	unknown	---	---	

	<i>JAZ12</i>	XM_004287641	NCBI	1	7358182	7359713
	<i>MYC2</i>	XM_004306579	NCBI	5	21462454	21464502
	<i>MYC2-like</i>	XM_004300191	NCBI	7	2955350	2956825
<i>Malus × domestica</i>	<i>JAZ1</i>	MDP0000187921	GDR	2	7244327	7245983
	<i>JAZ2</i>	MDP0000301927	GDR	2	8372230	8374641
	<i>JAZ3</i>	MDP0000193833	GDR	5	6838732	6839413
	<i>JAZ4</i>	MDP0000135375	GDR	5	6838979	6839660
	<i>JAZ5</i>	MDP0000174042	GDR	5	6844271	6844929
	<i>JAZ6</i>	MDP0000718271	GDR	5	6853674	6854332
	<i>JAZ7</i>	MDP0000173534	GDR	5	7470093	7470870
	<i>JAZ8</i>	MDP0000173535	GDR	5	7471658	7472625
	<i>JAZ9</i>	MDP0000889413	GDR	9	7857488	7859513
	<i>JAZ10</i>	MDP0000565690	GDR	9	17833692	17834409
	<i>JAZ11</i>	MDP0000891920	GDR	13	1192483	1193511
	<i>JAZ12</i>	MDP0000452772	GDR	13	1265966	1268289
	<i>JAZ13</i>	MDP0000244580	GDR	14	28471434	28476544
	<i>JAZ14</i>	MDP0000243322	GDR	14	28498846	28504454
	<i>JAZ15</i>	MDP0000871409	GDR	15	15877982	15879552
	<i>JAZ16</i>	MDP0000285658	GDR	15	45582157	45585617
	<i>JAZ17</i>	MDP0000241358	GDR	17	5165874	5166628
	<i>JAZ18</i>	MDP0000757701	GDR	unknown	---	---
	<i>MYC2a</i>	MDP0000029168	GDR	6	4922683	4924743
	<i>MYC2b</i>	MDP0000136498	GDR	17	7285196	7287475
	<i>MYC2-like1</i>	MDP0000242554	GDR	6	20029017	20033121
	<i>MYC2-like2</i>	MDP0000900024	GDR	4	20793943	20795433
	<i>MYC2-like3</i>	MDP0000442310	GDR	11	33202192	33208027
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>JAZ1</i>	Solyc07g042170	Sol Genomics Network	7	55184447	55186127
	<i>JAZ2</i>	Solyc12g009220	Sol Genomics Network	12	2502141	2505029
	<i>JAZ3</i>	Solyc03g122190	Sol Genomics Network	3	70102121	70105461
	<i>JAZ4</i>	Solyc12g049400	Sol Genomics Network	12	36916955	36921569
	<i>JAZ5</i>	Solyc03g118540	Sol Genomics Network	3	67429700	67434430

	<i>JAZ6</i>	Solyc01g005440	Sol Genomics Network	1	308184	313133
	<i>JAZ7</i>	Solyc11g011030	Sol Genomics Network	11	4085260	4089578
	<i>JAZ8</i>	Solyc06g068930	Sol Genomics Network	6	42758254	42759870
	<i>JAZ9</i>	Solyc08g036640	Sol Genomics Network	8	10528948	10529900
	<i>JAZ10</i>	Solyc08g036620	Sol Genomics Network	8	10645788	10646615
	<i>JAZ11</i>	Solyc08g036660	Sol Genomics Network	8	10475721	10478023
	<i>JAZ12</i>	Solyc01g009740	Sol Genomics Network	1	4097401	4108551
	<i>MYC2</i>	Solyc08g076930	Sol Genomics Network	8	60869757	60872241
<i>Vitis vinifera</i>	<i>JAZ1</i>	GSVIVG01011679001	Vitis Genoscope	1	5284029	5288246
	<i>JAZ2</i>	GSVIVG01000967001	Vitis Genoscope	1	22328013	22331014
	<i>JAZ3</i>	GSVIVG01007188001	Vitis Genoscope	4	703	1712
	<i>JAZ4</i>	GSVIVG01016721001	Vitis Genoscope	9	647267	649385
	<i>JAZ5</i>	GSVIVG01021514001	Vitis Genoscope	10	6455988	6457349
	<i>JAZ6</i>	GSVIVG01021516001	Vitis Genoscope	10	6471500	6472777
	<i>JAZ7</i>	GSVIVG01021518001	Vitis Genoscope	10	6481575	6482572
	<i>JAZ8</i>	GSVIVG01021519001	Vitis Genoscope	10	5179406	5179432
	<i>JAZ9</i>	GSVIVG01015042001	Vitis Genoscope	11	683148	685564
	<i>JAZ10</i>	GSVIVG01023256001	Vitis Genoscope	12	20514823	20520056
	<i>JAZ11</i>	GSVIVG01008453001	Vitis Genoscope	17	1857303	1861568
	<i>MYC2</i>	GSVIVT00013156001	Vitis Genoscope	15	7426472	7428988
	<i>MYC2-like</i>	GSVIVT01019659001	Vitis Genoscope	2	2286157	2287242
<i>Oryza sativa</i>	<i>JAZ1</i>	Os04g55920	Rice Genome Anottation Project	2	33306461	33310232
	<i>JAZ2</i>	Os07g05830	Rice Genome Anottation Project	7	2804209	2801928
	<i>JAZ3</i>	Os08g33160	Rice Genome Anottation Project	8	20627940	20624903
	<i>JAZ4</i>	Os09g23660	Rice Genome Anottation Project	9	14060320	14055997
	<i>JAZ5</i>	Os04g32480	Rice Genome Anottation Project	4	19492574	19497154
	<i>JAZ6</i>	Os03g28940	Rice Genome Anottation Project	1	16410080	16407670
	<i>JAZ7</i>	Os07g42370	Rice Genome Anottation Project	7	25347985	25350251
	<i>JAZ8</i>	Os09g26780	Rice Genome Anottation Project	9	16275273	16273336
	<i>JAZ9</i>	Os03g08310	Rice Genome Anottation Project	1	4233042	4232001
	<i>JAZ10</i>	Os03g08330	Rice Genome Anottation Project	1	4248884	4249985

<i>JAZ11</i>	Os03g08320	Rice Genome Anottation Project	1	4236724	4238274
<i>JAZ12</i>	Os10g25290	Rice Genome Anottation Project	10	13070894	13069729
<i>JAZ13</i>	Os10g25230	Rice Genome Anottation Project	10	13032006	13030986
<i>JAZ14</i>	Os10g25250	Rice Genome Anottation Project	10	13046977	13042901
<i>JAZ15</i>	Os03g27900	Rice Genome Anottation Project	1	16026190	16025189
<i>MYC2</i>	Os10g42430	Rice Genome Anottation Project	10	22857123	22859886

¹Genome databases: *Arabidopsis thaliana* (TAIR10, <http://www.arabidopsis.org/>), *Fragaria vesca* (NCBI Genome, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/3314>), *Malus × domestica* (GDR, <https://www.rosaceae.org/>), *Vitis vinifera* (Grape genome database, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>), *Solanum lycopersicum* (SolGenomics Network, <https://www.solgenomics.net/>), *Oryza sativa* (Rice genome annotation project, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>).



Table S3.3. Primers sequences used for RT-qPCR analysis of the genes analyzed in this research. The primers were designed from full-length cDNA sequences of *Fragaria vesca*. The primers for *COI1* and *GAPDH* genes were obtained from Preuss et al. (2014). *COI1*, Coronatine-Insensitive 1; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *HDA*, Histone deacetylases; *JAM*, Jasmonate-Associated MYC2-like; *JAZ*, Jasmonate-ZIM-domain; *NINJA*, Novel Interactor of *JAZ*; *TPL*, *TOPLESS*, *PPD*, *PEAPOD*.

Gene (CDS)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>COI1</i>	TGATCTTTGGGGATGGCTCGCCC	TGAGCCGGATGCTCAACCACTACC	117
<i>JAZ1</i>	TGGGAGATCTGAACCTCGTC	TTCCTCGTITTCATCAC	130
<i>JAZ4-1/2/3</i>	AGAAGTGCTGGTGCACATTG	TGGGCATAAATCTGGAGGAC	133
<i>JAZ5</i>	CACCATGAACTTGCTCAACG	GAAAGGTCGCTGAAGACGAG	126
<i>JAZ7</i>	GGATGAGCAGACCAGACAGG	AAACATAAACCCGGCCATCG	59
<i>JAZ8.1</i>	GAGGAGGAACTGCAATTTGG	AAGAGGGAAGCCGGAATTAG	64
<i>JAZ8.2</i>	GTTGCAACCTGGAACCTGGAAC	ATGAAGGGACTCAAGGGAGC	71
<i>JAZ9</i>	TCCACAGCTCAATTGCAAAC	ACCATCACCTGTGGAAGGAC	51
<i>JAZ10</i>	TTCCAGAAGTTCCTCGAACG	GATTTCTGGCTGCAATCAC	116
<i>JAZ11</i>	GGTTGCAGAAAGGGCAAAGC	TTGCCAAAGGTATCCCTGCTC	95
<i>JAZ12</i>	GAAGCGTAGGGACAGATTGG	AACCGGAAGAAGCATCATTG	104
<i>MYC2</i>	AGGGGATCCTGTCTTTACC	TTCGGGTCCACAACCTCTAC	149
<i>MYC2-like</i>	AGTCCATCCTCAACGACACC	AACCACTCTGCGTCGGATAC	94
<i>NINJA</i>	AAGCGATTTGTTGGATCTGG	ATTTGGGTCCACGCTACTTG	84
<i>TPL1</i>	TGCTTACTCGAGGCACATTG	GCTGCTTATGGGGTGAGAG	128
<i>TPL2</i>	ATACTCTGTTTGGCCGCATC	TTCCATCAGTTGCTGTCGAG	65
<i>TPL3</i>	ATGATGCTCCTGGACTTTGG	TTCACCGTCTTTACCCGTTT	89
<i>TPL4</i>	CGAATCCTCTGTTCCGAGAG	AATGTCAGGATTGGCCTTG	128
<i>HDA6.1</i>	GTTTGGCGATTTCTTTCCAG	TCCGAAAATTCTCGTCATCC	116
<i>HDA6.2</i>	ATGGAGCTGAATCGGGTTGG	GCAGTTAGTGTCAAGGGTGG	101
<i>HDA19.1</i>	CTACCTCAGGACCAGACGC	TGGTTGAGCCGTAGTTGAC	149
<i>HDA19.2</i>	GGACAAGCAGCATTTGTCTC	ACCTACGTGCAGCATCTATCG	128
<i>JAM1</i>	GCTTACGAGCTGTTGTGCC	TTGAAGTGCCTCCTGCACTC	139
<i>JAM2</i>	GACAATTGGGTGTGCAGCAG	TCCATCGCCCCAAATCAAGG	122
<i>PPD1-1</i>	CCTGAGGGTCAGGCAAGTAG	CTCCAAGGTAGAAGTTGGTCCC	110
<i>GAPDH</i>	TTCATCACTACTGCCACCCAGAAGACTG	AGCAGGCAGAACCTTCCGACAG	132

Table S3.4. Basic information of JAZ/TIFY and MYC proteins of Arabidopsis and *Fragaria vesca*.

Arabidopsis				<i>Fragaria vesca</i>			
Protein	Accession	Length (aa)	EAR motif	Protein	Accession	Length (aa)	EAR motif
JAZ1/TIFY10a	NP_564075	253		JAZ1/TIFY10a*	XP_004287655	302	
JAZ2/TIFY10b	NP_565096	249		JAZ4.1/TIFY6b_X1*	XP_004297449	385	
JAZ3/TIFY6b	NP_566590	352		JAZ4.2/TIFY6b_X2*	XP_011463180	384	
JAZ4/TIFY6a	NP_001117450	310		JAZ4.3/TIFY6b_X3*	XP_011463182	360	
JAZ5/TIFY11a	NP_564019	274	DLNEPT LDLRL	JAZ5/TIFY11a*	XP_004303711	185	LELRL
JAZ6/TIFY11b	NP_565043	269	DLNEPT LELKL	JAZ7a/TIFY5b*	XP_011460207	139	LELRL
JAZ7/TIFY5b	NP_181007	148	LELRL	JAZ7b/TIFY5b*	XP_011467663	123	LELGL
JAZ8/TIFY5a	NP_564349	131	LELRL	JAZ8/TIFY5a*	XP_004293626	130	LELRL
JAZ9/TIFY7	NP_177227	267		JAZ9/TIFY6b*	XP_004299516	371	
JAZ10/TIFY9	NP_001154713	197		JAZ10/TIFY9*	XP_004310129	191	
JAZ11/TIFY3a	NP_189930	238		JAZ11/TIFY3a*	XP_011457581	186	
JAZ12/TIFY3b	NP_197590	187		JAZ12/TIFY3b*	XP_011461243	202	
JAZ13	NP_001078200	125		MYC2	XP_004300239	682	

MYC2	NP_174541	623	MYC2-like	XP_00430662	491
				7	
MYC3	NP_199488	592			
MYC4	NP_193522	589			
MYC5	NP_199495	511			

Note: *Arabidopsis* and *F. vesca* TIFY, JAZ and MYCs proteins were obtained from GenPept database (NCBI).

*In GenPept database (NCBI) these *Fragaria* proteins are named as TIFY proteins.



Table S3.5. Identity between *Arabidopsis thaliana* and *Fragaria vesca* JAZ proteins obtained by multiple alignment. Bold numbers indicate the highest identity of *F. vesca* TIFY and JAZ proteins comparing to *Arabidopsis*. JAZ, jasmonate ZIM-domain.

		<i>Fragaria vesca</i>											
		JAZ1	JAZ4.1	JAZ4.2	JAZ4.3	JAZ5	JAZ7a	JAZ7b	JAZ8	JAZ9	JAZ10	JAZ11	JAZ12
<i>Arabidopsis thaliana</i>	JAZ1	40.08	22.41	22.94	23.19	36.46	23.14	21.43	25.23	22.77	26.87	26.81	29.45
	JAZ2	38.17	23.93	24.03	24.40	40.70	21.14	23.21	25.00	21.78	26.72	24.26	29.93
	JAZ3	24.18	39.12	38.94	39.82	29.79	23.62	19.64	26.96	45.92	32.62	29.19	26.32
	JAZ4	23.96	37.59	37.36	38.58	35.24	25.49	23.91	30.53	41.29	36.13	32.71	26.36
	JAZ5	29.78	21.15	21.26	22.40	43.86	21.43	21.36	23.30	22.07	22.73	26.00	21.94
	JAZ6	28.82	20.85	20.95	22.34	43.71	23.14	18.75	20.54	20.93	22.14	22.73	24.68
	JAZ7	20.63	19.67	19.67	19.67	27.84	36.29	30.84	47.01	22.61	22.76	23.00	25.93
	JAZ8	23.97	22.88	22.88	22.88	26.37	36.89	36.79	42.74	20.18	24.04	19.19	25.47
	JAZ9	24.40	38.37	38.37	39.27	29.91	20.83	22.22	25.23	35.88	27.56	27.54	23.61
	JAZ10	16.53	20.15	20.15	20.15	22.62	19.80	18.63	19.05	20.33	31.47	21.98	23.71
	JAZ11	20.79	20.00	19.65	20.38	20.90	17.24	15.74	21.70	24.54	22.83	27.07	33.33
	JAZ12	23.03	20.11	20.22	22.42	23.08	17.92	19.35	23.91	25.29	30.56	32.52	40.36
	JAZ13	17.43	16.53	16.53	16.53	18.00	27.93	27.45	30.19	20.87	18.42	17.12	16.36

Table S3.6. Identity between MYCs transcription factors sequences of *Arabidopsis thaliana* and *Fragaria vesca* obtained by multiple alignment. Bold numbers indicate the highest identity of *F. vesca* MYCs comparing to *Arabidopsis*.

		<i>Fragaria vesca</i>	
		MYC2	MYC2-like
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MYC2	58.51	41.54
	MYC3	54.16	38.88
	MYC4	58.27	38.92
	MYC5	45.56	38.69



Table S3.7. Relative expression of JA signalling genes during development and ripening of *F. × ananassa* cv. Aromas fruits. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R), and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). Data were analyzed by one-way ANOVA test, and differences among means \pm SE (n = 3) were determined using LSD test. Different letters indicate significant differences between developmental stages ($p \leq 0.05$) for each gene. COI1, Coronatine-Insensitive 1; HDA, Histone deacetylases; JAM, Jasmonate-Associated MYC2-like; JAZ, Jasmonate-ZIM-domain; NINJA, Novel Interactor of JAZ; TPL, TOPLESS.

Gen	Days after anthesis (developmental stages)													
	0 (F)	10 (SG)	17 (LG)	20 (W)	21 (T)	23 (50%R)	25 (R)							
<i>FaCOI1</i>	1.62 \pm 0.24	a	1.2 \pm 0.18	ab	0.90 \pm 0.08	bc	1.01 \pm 0.07	bc	1.25 \pm 0.31	ab	0.92 \pm 0.15	bc	0.47 \pm 0.19	c
<i>FaMYC2</i>	19.07 \pm 2.37	a	5.62 \pm 2.40	b	1.97 \pm 1.10	b	1.15 \pm 0.43	c	1.14 \pm 0.27	c	0.69 \pm 0.26	c	0.29 \pm 0.11	c
<i>FaMYC2-like</i>	4.16 \pm 0.83	a	3.99 \pm 1.20	a	1.40 \pm 0.22	b	1.00 \pm 0.06	b	0.51 \pm 0.04	b	0.49 \pm 0.07	b	0.37 \pm 0.07	b
<i>FaJAZ1</i>	31.28 \pm 1.42	a	8.72 \pm 2.85	b	3.86 \pm 1.95	bc	1.08 \pm 0.32	cd	0.56 \pm 0.18	cd	0.09 \pm 0.02	d	0.03 \pm 0.01	d
<i>FaJAZ4-1/2/3</i>	1.28 \pm 0.06	a	1.10 \pm 0.09	ab	1.02 \pm 0.15	ab	1.01 \pm 0.1	ab	0.94 \pm 0.02	b	0.95 \pm 0.11	b	0.61 \pm 0.15	c
<i>FaJAZ5</i>	14.95 \pm 1.19	a	6.49 \pm 2.17	b	2.72 \pm 1.15	c	1.15 \pm 0.46	c	0.69 \pm 0.13	c	0.16 \pm 0.01	d	0.12 \pm 0.01	d
<i>FaJAZ7</i>	43.08 \pm 2.92	a	6.45 \pm 3.90	a	4.14 \pm 2.80	b	1.23 \pm 0.49	b	0.41 \pm 0.13	b	0.08 \pm 0.01	b	0.04 \pm 0.02	b
<i>FaJAZ8.1</i>	29.80 \pm 4.00	a	8.88 \pm 2.16	bc	10.72 \pm 5.45	b	1.17 \pm 0.49	cd	1.23 \pm 0.34	cd	0.18 \pm 0.05	d	0.19 \pm 0.09	d
<i>FaJAZ8.2</i>	29.62 \pm 8.63	a	5.56 \pm 1.19	a	6.90 \pm 3.07	b	1.05 \pm 0.24	b	0.91 \pm 0.21	b	0.16 \pm 0.05	b	0.06 \pm 0.01	b
<i>FaJAZ9</i>	5.51 \pm 1.52	a	2.79 \pm 0.37	b	2.53 \pm 0.83	b	1.01 \pm 0.12	b	2.67 \pm 0.54	b	1.48 \pm 0.18	b	1.39 \pm 0.13	b
<i>FaJAZ10</i>	149.38 \pm 5.75	a	46.62 \pm 19.76	b	9.45 \pm 7.85	c	2.03 \pm 1.52	c	1.12 \pm 0.41	c	nd	nd	nd	nd
<i>FaJAZ11</i>	3.31 \pm 0.68	a	1.38 \pm 0.29	b	0.87 \pm 0.09	c	0.84 \pm 0.01	c	1.41 \pm 0.37	b	1.28 \pm 0.29	b	0.94 \pm 0.37	b
<i>FaJAZ12</i>	5.76 \pm 0.20	a	3.34 \pm 0.23	b	1.39 \pm 0.15	c	1.01 \pm 0.11	c	0.46 \pm 0.07	d	0.34 \pm 0.04	d	0.27 \pm 0.01	d
<i>FaNINJA</i>	4.70 \pm 1.15	a	3.17 \pm 0.78	a	1.44 \pm 0.43	b	1.03 \pm 0.19	b	0.76 \pm 0.01	b	0.62 \pm 0.03	b	0.36 \pm 0.04	b
<i>FaTPL1</i>	1.38 \pm 0.04	a	0.92 \pm 0.04	b	0.65 \pm 0.17	c	1.02 \pm 0.13	b	0.51 \pm 0.03	c	0.53 \pm 0.08	c	0.21 \pm 0.03	d
<i>FaTPL2</i>	2.34 \pm 0.10	a	1.16 \pm 0.17	cde	0.75 \pm 0.17	e	1.01 \pm 0.08	de	1.37 \pm 0.10	cd	2.07 \pm 0.32	ab	1.65 \pm 0.19	bc
<i>FaTPL3</i>	2.18 \pm 0.05	a	1.26 \pm 0.12	b	0.85 \pm 0.19	b	1.02 \pm 0.13	b	2.11 \pm 0.24	a	1.12 \pm 0.16	b	1.76 \pm 0.13	a
<i>FaTPL4</i>	1.92 \pm 0.06	a	1.44 \pm 0.15	b	0.85 \pm 0.15	cd	1.00 \pm 0.06	c	0.63 \pm 0.07	de	0.55 \pm 0.05	ef	0.30 \pm 0.01	f
<i>FaHDA6.1</i>	2.26 \pm 0.17	a	1.11 \pm 0.08	bc	0.86 \pm 0.06	c	1.00 \pm 0.02	bc	1.36 \pm 0.35	bc	1.56 \pm 0.41	b	1.01 \pm 0.13	bc
<i>FaHDA6.2</i>	1.80 \pm 0.09	a	1.30 \pm 0.11	b	1.13 \pm 0.09	bc	1.00 \pm 0.04	c	0.94 \pm 0.04	cd	1.07 \pm 0.06	bc	0.75 \pm 0.08	d
<i>FaHDA19.1</i>	2.14 \pm 0.14	a	1.55 \pm 0.18	b	1.09 \pm 0.30	bc	1.02 \pm 0.13	c	0.89 \pm 0.20	b	0.85 \pm 0.05	b	0.65 \pm 0.04	c
<i>FaHDA19.2</i>	1.89 \pm 0.09	a	1.15 \pm 0.09	b	0.78 \pm 0.11	c	1.01 \pm 0.08	bc	1.15 \pm 0.13	b	0.99 \pm 0.07	bc	0.80 \pm 0.18	c
<i>FaJAM1</i>	11.46 \pm 2.42	a	4.14 \pm 1.33	b	1.74 \pm 0.55	bc	1.04 \pm 0.20	bc	1.07 \pm 0.08	bc	0.67 \pm 0.04	c	0.39 \pm 0.05	c
<i>FaJAM2</i>	1.33 \pm 0.03	a	1.06 \pm 0.12	a	0.70 \pm 0.18	bcd	1.02 \pm 0.14	ab	0.73 \pm 0.07	bc	0.69 \pm 0.05	cd	0.39 \pm 0.07	d

Table S3.8. LOG(10) transformed values used for heatmaps construction of JA-signalling genes during development and ripening of *F. × ananassa* cv. Aromas fruits. Developmental stages correspond to 0 (flowering, F), 10 (small green, SG), 17 (large green, LG), 20 (white, W), 21 (turning, T), 23 (50% red receptacle, 50%R), and 25 (100% red receptacle, R) days after anthesis (DAA). COI1, Coronatine-Insensitive 1; HDA, Histone deacetylases; JAM, Jasmonate-Associated MYC2-like; JAZ, Jasmonate-ZIM-domain; NINJA, Novel Interactor of JAZ; TPL, TOPLESS.

Gen	Days after anthesis (developmental stages)						
	0 (F)	10 (SG)	17 (LG)	20 (W)	21 (T)	23 (50%R)	25 (R)
<i>FaCOI1</i>	0.21	0.08	-0.05	0.00	0.09	-0.04	-0.33
<i>FaMYC2</i>	1.28	0.75	0.29	0.06	0.05	-0.16	-0.54
<i>FaMYC2-like</i>	0.62	0.60	0.14	0.00	-0.30	-0.32	-0.44
<i>FaJAZ1</i>	1.50	0.94	0.59	0.03	-0.25	-1.10	-1.70
<i>FaJAZ4-1/2/3</i>	0.10	0.04	0.00	0.00	-0.03	-0.03	-0.21
<i>FaJAZ5</i>	1.17	0.81	0.43	0.06	-0.17	-0.80	-0.96
<i>FaJAZ7</i>	1.63	0.81	0.62	0.09	-0.40	-1.15	-1.40
<i>FaJAZ8.1</i>	1.47	0.95	1.03	0.07	0.09	-0.77	-0.74
<i>FaJAZ8.2</i>	1.47	0.74	0.84	0.02	-0.05	-0.80	-1.30
<i>FaJAZ9</i>	0.74	0.45	0.40	0.00	0.42	0.17	0.14
<i>FaJAZ10</i>	1.88	1.38	0.69	0.02	-0.23	nd	nd
<i>FaJAZ11</i>	0.66	0.27	0.08	0.01	0.28	0.24	0.11
<i>FaJAZ12</i>	0.76	0.52	0.14	0.00	-0.35	-0.48	-0.59
<i>FaNINJA</i>	0.67	0.50	0.16	0.01	-0.12	-0.20	-0.45
<i>FaTPL1</i>	0.14	-0.04	-0.19	0.01	-0.29	-0.28	-0.68
<i>FaTPL2</i>	0.37	0.06	-0.13	0.00	0.14	0.32	0.22
<i>FaTPL3</i>	0.34	0.10	-0.07	0.01	0.32	0.05	0.24
<i>FaTPL4</i>	0.28	0.16	-0.07	0.00	-0.20	-0.26	-0.53
<i>FaHDA6.1</i>	0.35	0.05	-0.07	0.00	0.13	0.19	0.00

<i>FaHDA6.2</i>	0.26	0.11	0.05	0.00	-0.03	0.03	-0.12
<i>FaHDA19.1</i>	0.33	0.19	0.04	0.01	-0.06	-0.07	-0.19
<i>FaHDA19.2</i>	0.28	0.06	-0.11	0.00	0.06	0.00	-0.10
<i>FaJAM1</i>	1.06	0.62	0.24	0.02	0.03	-0.18	-0.41
<i>FaJAM2</i>	0.12	0.02	-0.16	0.01	-0.14	-0.16	-0.41



Table S3.9. Relative expression of *FaMYC2*, *FaJAZ1* and *FaJAZ8.1* after 100 μ M MeJA treatment. Expression levels were measured at 15 min, 30 min, 1 h and 6 h of MeJA incubation. At each treatment and time, three biological replicates were used for the different analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA test, and differences among means \pm SE (n = 3) were determined using LSD test. Asterisks (*) indicate significant differences between control and MeJA treatment ($p \leq 0.05$) for each gene. JAZ, Jasmonate-ZIM-domain.

Gen	Treatment								
	T0	15 min		30 min		1 h		6 h	
		Control	MeJA	Control	MeJA	Control	MeJA	Control	MeJA
<i>FaMYC2</i>	1.00 \pm 0.10	3.48 \pm 0.18	6.32 \pm 2.07*	2.09 \pm 0.47	5.84 \pm 1.40*	1.95 \pm 0.56	3.26 \pm 1.91	1.81 \pm 0.17	3.94 \pm 0.58*
<i>FaJAZ1</i>	1.01 \pm 0.13	1.07 \pm 0.24	1.47 \pm 0.11	1.72 \pm 0.26	3.06 \pm 0.82*	1.46 \pm 0.28	1.80 \pm 0.82	3.65 \pm 2.63	2.63 \pm 0.89*
<i>FaJAZ8.1</i>	1.06 \pm 0.39	7.24 \pm 1.48	3.25 \pm 2.78	12.24 \pm 7.95	10.52 \pm 0.45	9.74 \pm 5.49	7.81 \pm 0.06	14.19 \pm 2.84	38.50 \pm 9.68*

Table S3.10. Original FPKM values of JA-signalling genes in *F. × ananassa* cv. Camarosa obtained from RNAseq experiments (Sanchez-Sevilla et al. 2017). *FaJAZ12* gene was not found in RNAseq experiments from Sanchez-Sevilla et al. (2017). Developmental stages correspond to GA (green achene), GR (green receptacle), RA (ripe achene), RR (ripe receptacle), TA (turning achene), TR (turning receptacle), WA (white achene), WR (white receptacle). COI1, Coronatine-Insensitive 1; HDA, Histone deacetylases; JAM, Jasmonate-Associated MYC2-like; JAZ, Jasmonate-ZIM-domain; NINJA, Novel Interactor of JAZ; TPL, TOPLESS.

Gene	Achenes					Receptacle		
	GA_FPKM	WA_FPKM	TA_FPKM	RA_FPKM	GR_FPKM	WR_FPKM	TR_FPKM	RR_FPKM
<i>FaCOI1</i>	31,77	38,22	26,83	24,19	41,87	52,27	64,02	61,81
<i>FaMYC2</i>	34,32	44,86	23,07	7,03	118,89	37,69	28,25	12,37
<i>FaMYC2-like</i>	8,43	0,08	0,04	0,07	14,25	0,06	0,01	0,02
<i>FaJAZ1</i>	114,14	95,92	105,64	69,26	258,17	7,92	2,16	2,76
<i>FaJAZ4-1/2/3</i>	12,64	21,43	21,92	13,00	21,53	25,35	28,32	27,10
<i>FaJAZ5</i>	291,47	143,23	98,53	34,81	702,87	50,17	16,84	36,60
<i>FaJAZ7</i>	9,40	0,57	0,81	0,24	35,87	0,07	0,10	0,25
<i>FaJAZ8.1</i>	102,33	98,17	31,86	35,83	27,54	0,01	0,00	0,07
<i>FaJAZ8.2</i>	7,76	3,20	0,25	0,62	405,02	11,72	8,77	20,05
<i>FaJAZ9</i>	10,89	29,18	47,96	46,87	32,12	13,96	18,56	29,72
<i>FaJAZ10</i>	49,44	7,39	1,54	1,40	107,17	1,18	0,40	2,29
<i>FaJAZ11</i>	2,76	1,24	1,13	1,39	1,44	0,48	0,36	0,84
<i>FaNINJA</i>	30,49	14,60	16,44	13,46	35,17	13,71	14,97	12,52
<i>FaTPL1</i>	24,71	8,09	7,65	11,39	44,06	52,51	33,81	30,18
<i>FaTPL2</i>	27,60	25,06	47,94	67,23	10,68	31,90	50,60	106,98
<i>FaTPL3</i>	30,55	16,34	23,21	40,24	22,50	30,42	34,83	52,66
<i>FaTPL4</i>	33,95	30,60	63,66	38,23	34,22	59,76	311,39	408,60
<i>FaHDA6.1</i>	11,68	26,21	38,29	37,32	8,98	13,73	14,86	18,83

<i>FaHDA6.2</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>FaHDA19.1</i>	62,71	58,51	57,77	67,31	59,02	57,73	58,99	60,09
<i>FaHDA19.2</i>	10,73	6,97	10,45	12,76	9,07	11,82	15,72	14,52
<i>FaJAM1</i>	19,93	6,83	8,20	6,87	17,84	6,29	6,07	4,36
<i>FaJAM2</i>	10,99	5,31	11,76	11,63	11,85	12,50	9,20	6,40



Table S3.11. LOG(10) transformed values from original FPKM values of JA-signalling genes obtained in *F. × ananassa* cv. Camarosa from RNAseq experiments (Sanchez-Sevilla et al. 2017). *FaJAZ12* gene was not found in RNAseq experiments from Sanchez-Sevilla et al. (2017). Developmental stages correspond to GA (green achene), GR (green receptacle), RA (ripe achene), RR (ripe receptacle), TA (turning achene), TR (turning receptacle), WA (white achene), WR (white receptacle). COI1, Coronatine-Insensitive 1; HDA, Histone deacetylases; JAM, Jasmonate-Associated MYC2-like; JAZ, Jasmonate-ZIM-domain; NINJA, Novel Interactor of JAZ; TPL, TOPLESS.

Gene	Achenes				Receptacle			
	GA	WA	TA	RA	GR	WR	TR	RR
<i>FaCOI1</i>	1.50	1.58	1.43	1.38	1.62	1.72	1.81	1.79
<i>FaMYC2</i>	1.54	1.65	1.36	0.85	2.41	0.90	0.33	0.44
<i>FaMYC2-like</i>	0.93	-1.10	-1.40	-1.14	1.33	1.40	1.45	1.43
<i>FaJAZ1</i>	2.06	1.98	2.02	1.84	2.85	1.70	1.23	1.56
<i>FaJAZ4-1/2/3</i>	1.10	1.33	1.34	1.11	1.44	-1.87	0.00	-1.17
<i>FaJAZ5</i>	2.46	2.16	1.99	1.54	2.61	1.07	0.94	1.30
<i>FaJAZ7</i>	0.97	-0.25	-0.09	-0.62	1.55	-1.13	-0.99	-0.60
<i>FaJAZ8.1</i>	2.01	1.99	1.50	1.55	1.51	1.15	1.27	1.47
<i>FaJAZ8.2</i>	0.89	0.50	-0.60	-0.21	2.03	0.07	-0.39	0.36
<i>FaJAZ9</i>	1.04	1.47	1.68	1.67	0.16	-0.31	-0.45	-0.08
<i>FaJAZ10</i>	1.69	0.87	0.19	0.15	2.08	1.58	1.45	1.09
<i>FaJAZ11</i>	0.44	0.09	0.05	0.14	1.15	-1.21	-2.09	-1.79
<i>FaNINJA</i>	1.48	1.16	1.22	1.13	1.55	1.14	1.18	1.10
<i>FaTPL1</i>	1.39	0.91	0.88	1.06	1.64	1.72	1.53	1.48
<i>FaTPL2</i>	1.44	1.40	1.68	1.83	1.03	1.50	1.70	2.03
<i>FaTPL3</i>	1.49	1.21	1.37	1.60	1.35	1.48	1.54	1.72
<i>FaTPL4</i>	1.53	1.49	1.80	1.58	1.53	1.78	2.49	2.61
<i>FaHDA6.1</i>	1.07	1.42	1.58	1.57	0.95	1.14	1.17	1.27
<i>FaHDA6.2</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>FaHDA19.1</i>	1.80	1.77	1.76	1.83	1.77	1.76	1.77	1.78
<i>FaHDA19.2</i>	1.03	0.84	1.02	1.11	0.96	1.07	1.20	1.16
<i>FaJAM1</i>	1.30	0.83	0.91	0.84	1.25	0.80	0.78	0.64
<i>FaJAM2</i>	1.04	0.73	1.07	1.07	1.07	1.10	0.96	0.81

Capítulo 4: Una nueva secuencia degron de la proteína JAZ1 de *Fragaria* × *ananassa* permite la interacción COI1-JAZ1 mediada por coronatina

Garrido-Bigotes, A., Valenzuela-Riffo, F., Solano, R., Torrejón, M., Morales-Quintana, L. & Figueroa, C. “Una nueva secuencia degron de la proteína JAZ1 de *Fragaria* × *ananassa* permite la interacción COI1-JAZ1 mediada por coronatina”. (En preparación).

4.1. Resumen.

Los jasmonatos (JAs) intervienen en multitud de procesos del desarrollo y frente a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico. Los niveles de JAs se incrementan ante estímulos ambientales e internos, y esto es percibido por el complejo co-receptor COI1-JAZ para la activación de las respuestas a JAs. El objetivo de este estudio fue conocer la conservación del mecanismo de percepción de los JAs, así como la funcionalidad de un nuevo degron que media la formación complejo co-receptor COI1-JAZ1 en *Fragaria* × *ananassa*. Para ello, se aislaron las secuencias codificantes de *FaCOI1*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* de *F. × ananassa*, y se realizaron alineamientos múltiples y análisis filogenéticos comparándolas con sus ortólogos en otras especies tales como *Fragaria vesca*, *Arabidopsis thaliana*, *Malus × domestica*, *Vitis vinifera* y *Solanum lycopersicum*. Adicionalmente, se clonaron las secuencias mediante tecnología ‘Gateway’ y se realizaron estudios de interacción proteína-proteína en el sistema de doble híbrido de levadura. El co-receptor *FaCOI1* mostró una alta conservación, al igual que los represores *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10*. Por otro lado, la proteína *FaJAZ1* contiene una secuencia degron IPMQRK diferente al degron canónico LPIAR(R/K) reportado en *Arabidopsis*, y esta permite la interacción de *FaJAZ1* con el co-receptor *FaCOI1* en presencia de coronatina (COR), en ensayos de doble híbrido de levadura. Por lo tanto, el degron IPMQRK es funcional para la formación del complejo co-receptor COI1-JAZ1 en presencia de COR, sugiriendo que el mecanismo de percepción de JAs es funcional en *F. × ananassa* para el caso de *FaJAZ1*.

4.2. Introducción.

Los jasmonatos (JAs) a través de la activación de su vía de señalización desencadenan las respuestas hormonales (Chini, Gimenez-Ibañez, Goossens, & Solano, 2016), en respuesta a estrés biótico y abiótico, así como en diferentes procesos del desarrollo como, por ejemplo, la acumulación de antocianinas (Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017). La biosíntesis de JA-Ile bioactivo es desencadenada por la integración de señales ambientales y estímulos internos, y la percepción de esta molécula señal es la etapa clave en la activación de las respuestas a JAs (Chini, Gimenez-Ibañez, Goossens, & Solano, 2016).

La proteína COI1 forma parte del complejo ubiquitina ligasa Skp-Cullin-F-box-type E3 (SCF^{COI1}) y es el co-receptor de JA-Ile, junto con las proteínas JAZ (Sheard et al., 2010; Sheard et al., 2010; Xie, Feys, James, Nieto-Rostro, & Turner, 1998). Después de un aumento de los niveles de JA-Ile, este interacciona con la proteína COI1, lo que a su vez promueve la interacción con las proteínas represoras JAZ, formando el complejo receptor COI1-JA-Ile-JAZ (Sheard et al., 2010), donde también participa el cofactor inositol pentaquisfosfato (InsP₅; Sheard et al., 2010). Esto permite la ubiquitinación de las proteínas JAZ y la degradación de las mismas por el proteasoma 26S (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), lo que permite la unión de los factores de transcripción (FTs) MYC2 a las secuencias promotoras para la activación de las respuestas a JAs (Chini et al., 2007; Chini, Gimenez-Ibañez, Goossens, & Solano, 2016; Thines et al., 2007).

La proteína COI1 ha sido previamente caracterizada en *Arabidopsis* (Sheard et al., 2010) y los mutantes *coi1* tienen anulada la respuesta a JAs (Xie et al., 1998), mostrando una reducción en la acumulación de antocianinas (Shan, Zhang, Peng, Wang, & Xie, 2009). La estructura de la proteína COI1 en *Arabidopsis* muestra un dominio F-box y 18 dominios LRR (Sheard et al., 2010), y posee homología estructural con el receptor de auxinas TIR1 en *Arabidopsis* (Dharmasiri, Dharmasiri, & Estelle, 2005; Han, 2017). Además, la proteína COI1 ha sido reportada en diversas especies como *Vitis vinífera* (Zhang et al., 2012), *Solanum lycopersicum* (Melotto et al., 2008; Thines et al., 2007), *Malus × domestica* (An, Hao, Li, Xu, & Cheng, 2017), sin embargo, en *F. × ananassa* únicamente fueron reportados los niveles de expresión relativa durante el desarrollo (Preuß et al., 2014).

Las proteínas JAZ pertenecen a la familia TIFY (Bai, Meng, Huang, Qi, & Chen, 2011; Vanholme, Grunewald, Bateman, Kohchi, & Gheysen, 2007), y han sido previamente caracterizadas en *F. vesca* (Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, & Figueroa, 2018), *M. × domestica* (Li et al., 2015), *V. vinífera* (Zhang et al., 2012) y *S. lycopersicum* (Chini, Ben-

Romdhane, Hassairi, & Aboul-Soud, 2017). Estas contienen dos dominios altamente conservados, el dominio TIFY que permite la dimerización de las proteínas JAZ y la interacción con la proteína adaptadora NINJA (Chini, Fonseca, Chico, Fernández-Calvo, & Solano, 2009; Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011; Vanholme et al., 2007), y el dominio Jas que interacciona con la proteína COI1 y los FTs (A. Chini et al., 2007; Katsir, Schillmiller, Staswick, He, & Howe, 2008; Melotto et al., 2008; Pauwels & Goossens, 2011). Además, el dominio Jas se caracteriza por tener una secuencia de degron canónica LPIAR(R/K) para la interacción con COI1 y JA-Ile en *Arabidopsis* (Sheard et al., 2010). En *F. vesca*, algunas proteínas JAZ contienen en su dominio Jas secuencias de degron alternativas a LPIAR(R/K), por ejemplo, FvJAZ1 tiene la secuencia IPMQRK (Garrido-Bigotes et al., 2018), sin embargo, su funcionalidad en la percepción de los JAs no ha sido evaluada hasta el momento. Por otro lado, algunas proteínas como AtJAZ7, AtJAZ8 y sus ortólogos en *F. vesca* FvJAZ7, FvJAZ8.1 y FvJAZ8.2, carecen de esta secuencia de degron (Garrido-Bigotes et al., 2018; Shyu et al., 2012), y esto hace a la proteína más estable y dificulta su degradación por el proteasoma 26S en *Arabidopsis* (Shyu et al., 2012).

En *Arabidopsis* se ha reportado la interacción entre COI1 y algunas proteínas JAZ mediado por JA-Ile (Fonseca et al., 2009) y coronatina (COR), que es un análogo estructural y funcional del JA bioactivo (Fonseca et al., 2009; Katsir et al., 2008; Melotto et al., 2008). En *M. × domestica* la proteína JAZ2 interaccionan con COI1 (An et al., 2017) y en *S. lycopersicum*, SlCOI1 interacciona con la proteína JAZ1 de *A. thaliana* (Melotto et al., 2008) en ambos casos mediado por COR, sugiriendo que el mecanismo de percepción hormonal de los JAs está conservado en otras especies diferentes de *A. thaliana*. En especies de frutos no climatéricos como *F. × ananassa*, la funcionalidad del complejo co-receptor COI1-JAZ es desconocida.

El objetivo de esta investigación fue conocer la conservación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10, analizar las relaciones evolutivas de estas proteínas y el estudio funcional del complejo co-receptor COI1-JAZ en *F. × ananassa*.

4.3. Material y Métodos.

4.3.1. Material Vegetal y Extracción de ARN.

Las flores y los frutos de *Fragaria × ananassa* cv. Aromas fueron cosechados en un campo de Angol, Región de la Araucanía, Chile (latitud 37°45'18"S; longitud 72°36'49"O), y fueron transportados al laboratorio en condiciones de refrigeración. Posteriormente, los frutos fueron clasificados en diferentes estadios de desarrollo: verde pequeño (SG), verde grande

(LG), blanco (W), transición (T), 50% maduro (50%R) y 100% maduro (R), que se corresponden con 10, 17, 20, 21, 23 y 25 días post-antesis, respectivamente.

El ARN total fue extraído a partir de cada estadio de desarrollo de las flores y los frutos de *F. × ananassa* cv. Aromas, usando el método CTAB con modificaciones (Liao et al., 2004) y el kit de extracción por columna 'RNeasy Plus Mini Kit' (Qiagen, Alemania). La integridad del ARN fue evaluada mediante gel de agarosa y las muestras de ARN fueron cuantificadas.

4.3.2. Síntesis de ADN complementario y amplificación de secuencias codificantes.

La síntesis de ADN complementario se realizó a partir de 1 µg de ARN total usando kit 'RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit' (ThermoScientific, Finlandia). La integridad del ADN complementario se verificó mediante transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR).

Las secuencias codificantes (CDS) de *COII* (No. accesión: XM_004307565), *JAZI* (No. accesión: XM_004287607), *JAZ8.1* (No. accesión: XM_004293578) y *JAZ10* (No. accesión: XM_004310081) de *F. vesca* (Garrido-Bigotes et al., 2018), se usaron como templatado para el diseño de primers, a los que se les agregaron las secuencias attB1 y attB2 a los extremos 5' y 3' de la CDS, respectivamente, usados para la clonación mediante la tecnología 'Gateway' (GW, Invitrogen, USA) (Tabla S4.1). Los aislamientos de las CDS se realizaron a partir del estadio de flor, donde hay una mayor expresión relativa de *FaCOII*, *FaJAZI*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10*, de acuerdo a lo reportado en Garrido-Bigotes et al., (2018). La amplificación se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa, usando la ADN polimerasa de alta fidelidad 'Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase' (ThermoScientific, Finlandia), y los productos de la misma fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C, 30 s; 35 ciclos de desnaturalización a 98°C, 10 s, annealing a 58°C, 30 s, y extensión a 72°C, 30 s /kb; extensión final a 72°C, 10 min. A continuación, los productos de la amplificación se verificaron y purificados a partir del gel de agarosa, con el kit 'Zymoclean Gel DNA Recovery Kit' (ZymoResearch, USA). Finalmente, los productos purificados se cuantificaron usando el nanofotómetro 'Nanophotometer P-300' (Implen, Alemania) y la integridad de los mismos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

4.3.3. Clonación de secuencias codificantes mediante recombinación 'Gateway'.

Las secuencias attB1-CDS-attB2 de *FaCOII*, *FaJAZI*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* fueron clonadas mediante tecnología GW en el vector dador pDONR207 (Fig. S4.1A), usando la recombinasa 'Gateway BP Clonase II Enzyme Mix' (Invitrogen, USA). Las condiciones de la

recombinación BP (recombinación entre sitios attB y attP) se indican en la Tabla S4.2. A continuación, bacterias de *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes se transformaron con 5 μ L de la reacción de recombinación BP y se plaquearon en medio LB semisólido con antibiótico gentamicina (2,5 μ g/mL). Las bacterias se incubaron 12-16 h hasta la aparición de colonias. La recombinación de las CDS en el vector dador se verificó mediante PCR de colonias, usando *Taq* polimerasa recombinante (Fermentas), con las condiciones indicadas por el fabricante. Los clones positivos se crecieron en medio LB líquido con antibiótico gentamicina durante 16 h, y los constructos pDONR207-*FaCOII/JAZI/JAZ8/JAZ10* se purificaron por miniprep mediante el kit 'PureYield Plasmid Miniprep System' (Promega, USA). Los constructos se secuenciaron mediante secuenciación Sanger (Macrogen Inc, Korea del Sur), y las CDS se tradujeron a proteína mediante el software EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). Posteriormente, las respectivas secuencias se subieron al NCBI: *FaCOII* (No. accesión: MF511103), *FaJAZI* (No. accesión: MF511104), *FaJAZ8.1* (No. accesión: MF511105) y *FaJAZ10* (No. accesión: MF511106).

Los constructos pDONR207-*FaJAZI/JAZ8/JAZ10* se recombinaron en el vector destino pGADT7 (Fig. S4.2A), mientras que pDONR207-*FaCOII* se recombinó en el vector destino pGBKT7 (Fig. S4.2B), usando la recombinasa 'Gateway LR Clonase II Enzyme Mix' (Invitrogen, USA). Las condiciones de la recombinación LR (recombinación entre sitios attL y attR) se muestran en la Tabla S4.2. Posteriormente, 5 μ L de reacción de recombinación LR se usaron para transformar bacterias de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes, y estas se plaquearon en medio LB semisólido con antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) para crecer los transformantes con pGADT7, y kanamicina (2,5 μ g/mL) para los transformantes de pGBKT7. Las bacterias se incubaron 12-16 h hasta la aparición de colonias. La recombinación de las CDS en el vector dador se verificó mediante PCR de colonias, usando *Taq* polimerasa recombinante (Fermentas), con las condiciones indicadas por el fabricante. Los clones positivos se crecieron en medio LB líquido con antibiótico ampicilina o kanamicina. Posteriormente, las construcciones pGADT7-*FaJAZI/JAZ8/JAZ10* y pGBKT7-*FaCOII* (Fig. S4.2C-D) se purificaron por miniprep mediante el kit 'PureYield Plasmid Miniprep System' (Promega, USA), y fueron verificados mediante RT-PCR. Las construcciones de *AtJAZI*, *AtJAZ8* y *AtJAZ9*, y *AtCOII* en los vectores destino pGADT7 y pGBKT7, respectivamente, fueron aportadas por el Laboratorio de Señalización Hormonal del Departamento de Genética Molecular de Plantas (Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España). Las

construcciones en los vectores destino se usaron para los ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H).

4.3.4. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético.

Las secuencias COI1, JAZ1, JAZ8 y JAZ10 de *F. × ananassa*, y los ortólogos de *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* se emplearon para los análisis de secuencias mediante alineamiento múltiple y análisis filogenético. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el software Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) y se visualizaron con el software Jalview (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009). Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método basado en distancias ‘Neighbor-Joining’, con un bootstrap de 1000 réplicas, usando software ‘CLC Sequence Viewer v8.0’ (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) y se visualizaron con el software Evolview (He et al., 2016). La secuencia de aminoácidos de TIR1 se usó como grupo externo para el enraizamiento del árbol filogenético de las proteínas COI1. Los números de accesoión de las secuencias empleadas en los análisis se indican en la Tabla S4.3.

4.3.5. Análisis de la secuencia ‘degron’.

Se realizaron análisis bioinformáticos para el estudio de la conservación de la secuencia ‘degron’ IPMQRK de FaJAZ1 y FvJAZ1, en otros miembros de la familia Rosaceae. La secuencia de aminoácidos IPMQRK se usó como ‘query’ para identificar, mediante BLASTP, secuencias idénticas en las bases de datos OneKP (<https://onekp.com/>) y Genome Database for Rosaceae (GDR, <https://www.rosaceae.org/>). Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con software Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) y se visualizaron con el software Jalview (Waterhouse et al., 2009). Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método basado en distancias ‘Neighbor-Joining’, con un bootstrap de 1000 réplicas, usando software ‘CLC Sequence Viewer v8.0’ (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) y visualizados con el software Evolview (He et al., 2016). Los números de accesoión de las secuencias empleadas en estos análisis se muestran en la Tabla Suplementaria 4.4.

4.3.6. Ensayos de Doble Híbrido de Levadura (Y2H).

4.3.6.1. Cepa de levadura y sistema doble híbrido.

La levadura empleada en los análisis fue *Saccharomyces cerevisiae* AH109 cuyo genotipo es MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, la cual

contiene TRP y LEU como marcadores de selección, e HIS3, ADE2 y LacZ como genes reporteros (Takara Bio USA, Inc.).

Los ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H) se desarrollaron usando el sistema 'Gateway GAL4' (Takara Bio USA, Inc.), que se caracteriza porque el activador de la transcripción GAL4 tiene dos dominios, el dominio de activación (AD) y dominio de unión al ADN (DBD). Ambos dominios pueden ser separados y expresados junto con proteínas de fusión, de forma que si las proteínas interactúan entre sí, los dominios AD y DBD del activador transcripcional se aproximan, y permiten la transcripción de los genes reporteros (Ma & Ptashne, 1987).

4.3.6.2. Transformación de levaduras.

La cepa de *S. cerevisiae* AH109 se creció en medio YPD/agar (BD, USA) suplementado con adenina (0,02% p/v) e se incubó durante 2 días a 30 °C hasta el crecimiento de colonias aisladas. Posteriormente, 50 mL de medio líquido YPD (BD, USA) suplementado con adenina (0,02%, YPDA) se inoculó con una colonia aislada, y se incubó a 30 °C, en agitación (250 rpm) durante 16 h, constituyendo el preinóculo. A continuación, 200 mL de medio líquido YPDA se inoculó con 6-8 mL de preinóculo hasta una OD₆₀₀ de 0,2-0,3. El cultivo se incubó a 30 °C durante 3-4 h hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-0,7. Posteriormente, los 200 mL de cultivo se transfirió a tubos de centrifuga estériles de 50 mL, y se centrifugó a 2200 rpm, 4 °C durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con 50 mL de agua nanopura estéril y se centrifugó a 2200 rpm y 4 °C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 1 mL de agua nanopura estéril. A continuación, se transfirieron las células a tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 400 mL de una solución de acetato de litio 10X, Tris-EDTA 10X y agua nanopura estéril. Se utilizaron 70 µL de células para las co-transformaciones.

En cada co-transformación se emplearon 300 ng de cada constructo pGADT7-(AD)-X y pGBKT7-(DBD)-Y previamente clonados (ver sección 4.3.3., siendo X las secuencias codificantes de FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ10, AtJAZ1, AtJAZ8 o AtJAZ9, e Y las secuencias codificantes de FaCOI1 o AtCOI1). También se incluyeron co-transformaciones de los vectores pGADT7-(AD) o pGBKT7-(DBD) vacíos como controles negativos. Para cada una de las co-transformaciones se mezclaron 300 ng de cada constructo, 10 µL de espermio de salmón, como ADN 'carrier', y 70 µL de células en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL. Posteriormente, se

agregaron 600 μ L de una solución de acetato de litio 10X, Tris-EDTA 10X y polietilenglicol al 50% p/v. Se mezcló mediante vórtex y se incubó a 37 °C, en agitación durante 30 min. A continuación, se agregaron 70 μ L de DMSO estéril a cada tubo, y se sometieron a estrés térmico a 42 °C durante 15 min. Las células se recuperaron en hielo durante 2 min y se centrifugaron a 11000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ L de agua nanopura estéril. Posteriormente, las células se sembraron en medio sintético definido (SD, Takara Bio USA, Inc.) suplementado con adenina (0,02% p/v), histidina (0,02% p/v) y drop-out (-Ade-His-Leu-Trp), para la selección de los transformantes. Las placas se incubaron durante 2-3 días hasta la aparición de colonias transformantes.

4.3.6.3. Evaluación de las interacciones JAZs-COIs.

Las colonias transformantes se re-suspendieron en agua nano pura estéril. Se realizaron diluciones 1:10 para medir la OD₆₀₀ inicial, la cual se ajustó a una OD₆₀₀ final de 1. A continuación, las interacciones se evaluaron en medio sintético definido (SD) para el crecimiento de levaduras, con diferentes auxotrofías: SD-Leu-Trp (-2), SD-Leu-Trp-His (-3), SD-Leu-Trp-His-Ade (-4), junto con SD-Leu-Trp-His (-3) y SD-Leu-Trp-His-Ade (-4) suplementados con 50 μ M coronatina (COR). Las placas se incubaron a 30 °C durante 5 días.

4.4. Resultados.

4.4.1. Aislamiento y clonación de las secuencias codificantes de *COI1*, *JAZ1*, *JAZ8.1* y *JAZ10* de *Fragaria* \times *ananassa*.

Las secuencias codificantes de *COI1*, *JAZ1*, *JAZ8.1* y *JAZ10* de *F. vesca* se usaron como plantilla para el diseño de primers y el aislamiento de las mismas en *F. \times ananassa* (Tabla S4.1). Se amplificaron las secuencias correspondientes a *COI1*, *JAZ1*, *JAZ8.1* y *JAZ10* utilizando ADN complementario desde estadio de flor de *F. \times ananassa*, y se obtuvieron bandas correspondientes a las CDS, junto con los extremos attBs, con tamaños esperados de 1849, 970, 454 y 637 pb, respectivamente (Fig. S4.3A). Posteriormente, las bandas se purificaron y su integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se observaron bandas del tamaño esperado para cada una de las secuencias (Fig. S4.3B). A continuación, las CDS con extremos attBs se recombinaron en el vector dador pDONR207 mediante recombinación BP, y la recombinación se verificó mediante PCR de colonias, obteniéndose los clones positivos para pDONR207-*FaCOI1*, -*FaJAZ1*, -*FaJAZ8.1* y -*FaJAZ10* (Fig. S4.4A-C). Posteriormente, se purificaron las construcciones de la colonia 2 de pDONR207-*FaCOI1*, la colonia 1 de pDONR207-*FaJAZ1* y -*FaJAZ8.1*, y la colonia 4 de -*FaJAZ10*. Las construcciones se enviaron

a MacroGen Inc. para secuenciación Sanger, y las secuencias codificantes y de aminoácidos se subieron al GeneBank (NCBI), con códigos de acceso asignados: *FaCOI1* (MF511103), *FaJAZ1* (MF511104), *FaJAZ8* (MF511105) y *FaJAZ10* (MF511106).

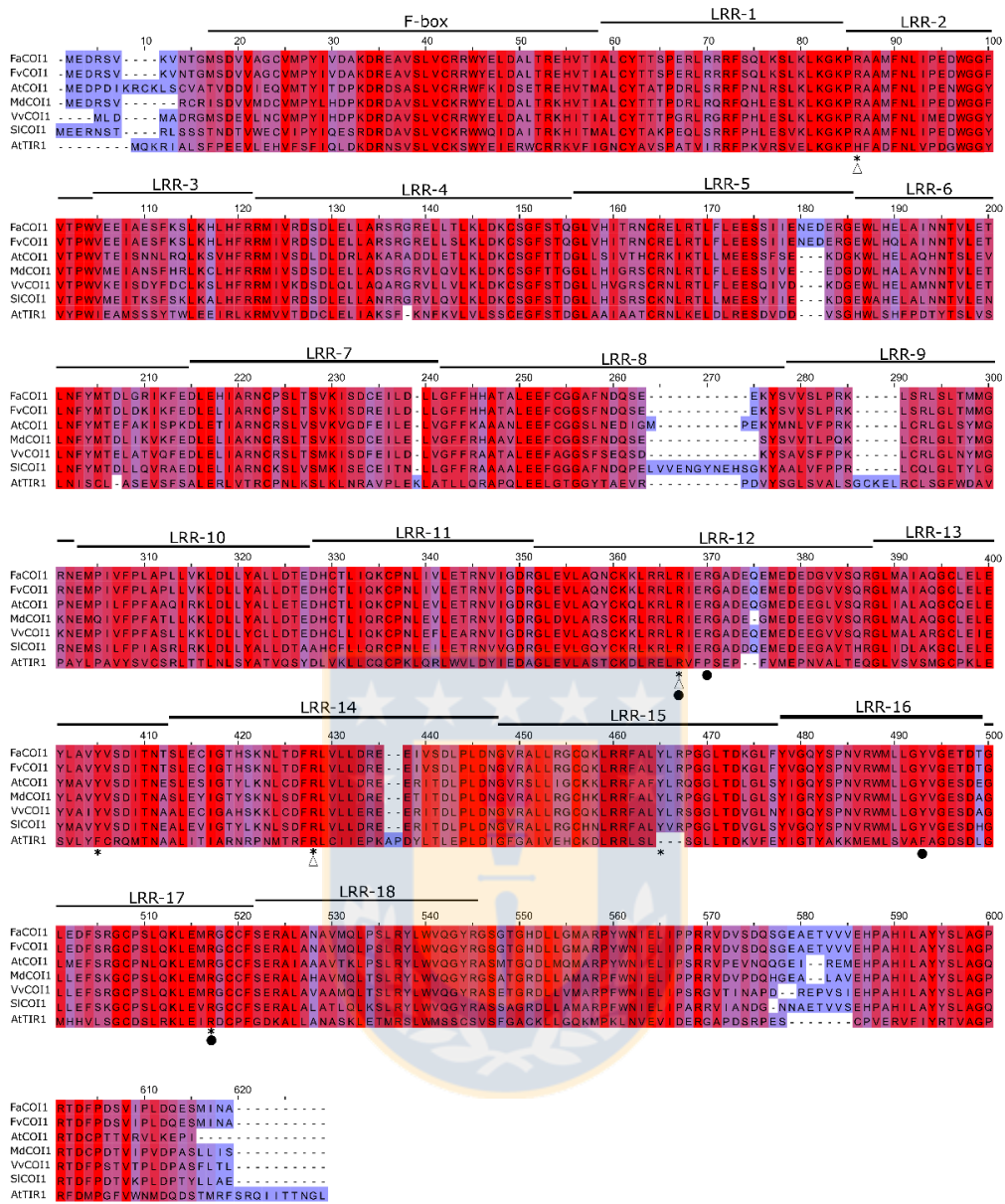
Una vez verificadas las secuencias codificantes, se realizó la recombinación LR entre pDONR207-*FaCOI1* y el vector destino pGBKT-(DBD), y pDONR207-*FaJAZ1*, -*FaJAZ8.1*, *FaJAZ10* y el vector destino pGADT7-(AD). Posteriormente, el producto de la recombinación se empleó para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes y la obtención de colonias recombinantes. Se realizó una PCR de colonias para verificar la recombinación en los vectores destino, y se obtuvieron los clones positivos de pGADT7-*FaJAZ1*, -*FaJAZ8*, -*FaJAZ10* y pGBKT7-*FaCOI1* en todas las colonias evaluadas (Fig. S4.5). Las respectivas construcciones se purificaron mediante miniprep para su posterior uso en los ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H).

4.4.2. COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 están conservadas en *Fragaria* × *ananassa*.

Con el fin de estudiar la conservación de las proteínas FaCOI1, FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 en *F. × ananassa*, se compararon las secuencias de aminoácidos con sus ortólogos en *M. × domestica*, *A. thaliana*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* (Fig. 4.1).

Se realizó alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos para estudiar la conservación de dominios y residuos de FaCOI1 implicados en la interacción con JA-Ile, InsP₅ y las proteínas JAZ (Fig. 4.1A). Las secuencias de aminoácidos de FaCOI1 y FvCOI1 mostraron una alta identidad entre sí (98,6%), seguido de MdCOI1 (81,7%), VvCOI1 (77,1%), y SlCOI1 (71,6%, Tabla S4.5). Por otro lado, AtCOI1 y AtTIR1 mostraron los menores valores de identidad, 69,6 y 34,1%, respectivamente (Tabla S4.5). Las proteínas FaCOI1 y FvCOI1 contienen el dominio F-box y 18 dominios LRR altamente conservados, respecto a sus ortólogos (Fig. 4.1A). Específicamente, los residuos de aminoácidos R81, R345, Y383, R406, Y441 y R493 para la interacción con JA-Ile, R81, R345 y R406 para la interacción con InsP₅, R345, R348, Y469 y R494 para la interacción con JAZ1, se encuentran conservados en FaCOI1, FvCOI1 y el resto de ortólogos (Fig. 4.1A). Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético para mostrar las relaciones filogenéticas entre las proteínas (Fig. 4.1B). Por un lado, AtCOI1 y TIR1 fueron agrupados en el grupo I, mientras que FaCOI1 y el resto de ortólogos agruparon juntos en el grupo II indicando una relación filogenética más cercana. Estos resultados indican que FaCOI1, FvCOI1 y MdCOI1 divergieron a partir de un ancestro común.

A



B

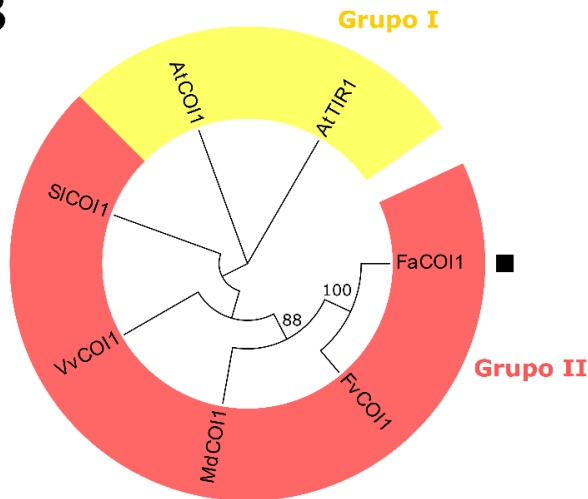
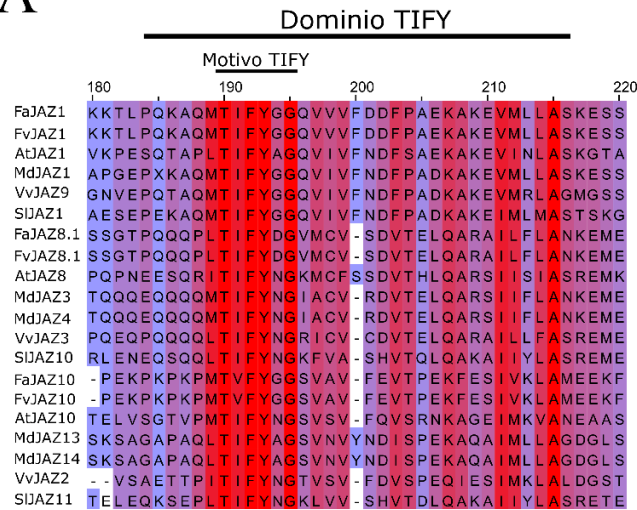


Fig. 4.1. Comparación de co-receptor COI1 de *Fragaria* × *ananassa* y sus ortólogos.

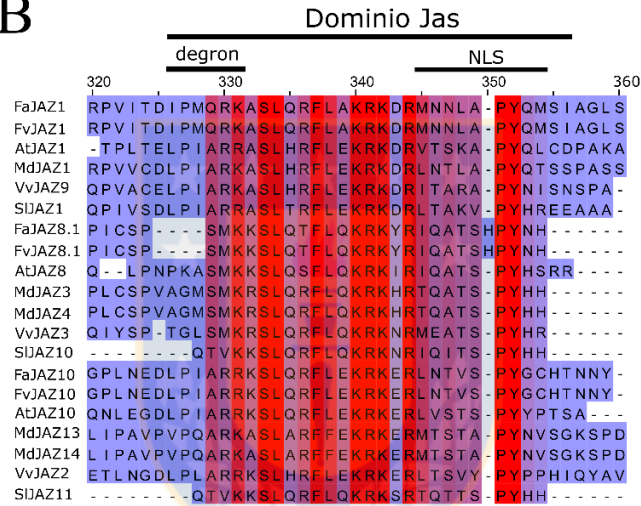
Alineamiento múltiple (A) y análisis filogenético de la secuencia de FaCOI1 con sus ortólogos en *Fragaria vesca*, *Malus* × *domestica*, *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* (B). En (A) ‘*’, ‘Δ’ y ‘●’ indican residuos conservados necesarios para la unión a JA-Ile, InsP₅ y JAZ1, respectivamente. En (A) color rojo significa 100% de identidad y variación hacia el azul indica una mayor diversidad de los residuos de aminoácidos. En (B) ‘■’ indica COI1 de *F. × ananassa*. FaCOI1, *Fragaria* × *ananassa* COI1; FvCOI1, *Fragaria vesca* COI1; AtCOI1, *Arabidopsis thaliana* COI1; MdCOI1, *Malus* × *domestica* COI1; VvCOI1, *Vitis vinifera* COI1; SlCOI1, *Solanum lycopersicum* COI1; AtTIR1, *Arabidopsis thaliana* TIR1.

Por otro lado, se realizó un alineamiento múltiple para estudiar la conservación entre las secuencias de aminoácidos de FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 y sus respectivos ortólogos (Fig. 4.2A). Se obtuvieron identidades de secuencias entre el 94-100% para FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 con sus equivalentes en *F. vesca* (Tabla S4.5). Específicamente, en el caso de FaJAZ1 y FaJAZ8.1 las secuencias de *M. × domestica* mostraron una alta identidad (Tabla S4.5), seguido de *V. vinifera* y *S. lycopersicum*, mientras que AtJAZ1 y AtJAZ8 mostraron los menores porcentajes de identidad (Tabla S4.5). Las proteínas FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 mostraron conservación de los dominios TIFY y Jas respecto a las secuencias del resto de especies (Fig. 4.2A-B), y FaJAZ8.1 junto con sus ortólogos carecen de la secuencia degren (Fig. 4.2B). Específicamente, FaJAZ1 y FvJAZ1 contienen una variante del degren en el dominio Jas, la variante IPMQRK (Fig. 4.2B). Sin embargo, la secuencia del resto del dominio Jas se encuentra altamente conservada en todas las proteínas JAZ estudiadas (Fig. 4.2B). Por otro lado, se realizó un análisis filogenético para estudiar las relaciones evolutivas entre las proteínas JAZ (Fig. 4.2C). La proteína FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ10 y sus ortólogos se reunieron conjuntamente en los grupos I, II y III, respectivamente (Fig. 4.2C), sin embargo, el ortólogo de FaJAZ10 de *S. lycopersicum*, SlJAZ11, se agrupó conjuntamente a los ortólogos de FaJAZ8.1 en el grupo II (Fig. 4.2C). En resumen, la conservación de las secuencias y los análisis filogenéticos indican una alta conservación de las proteínas JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 en *F. × ananassa*.

A



B



C

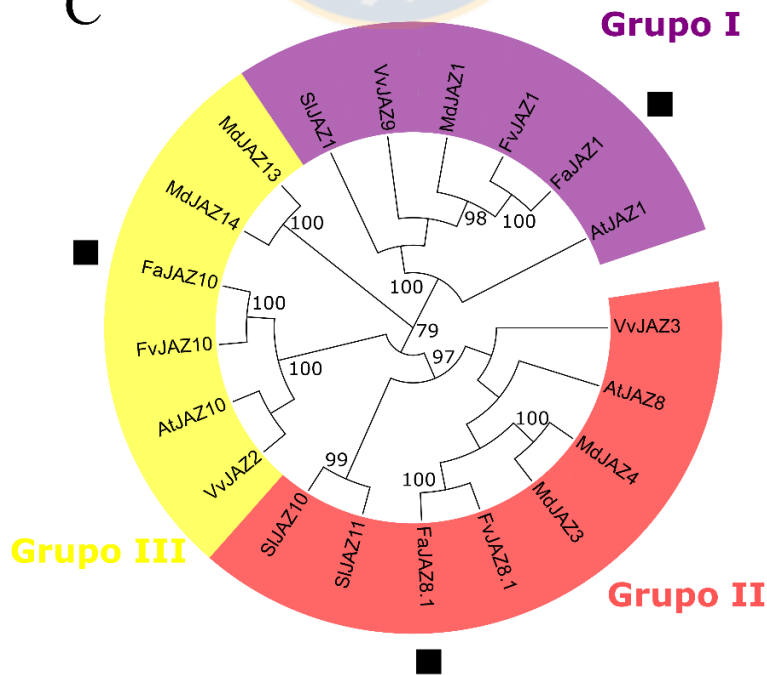


Fig. 4.2. Comparación de JAZ1, JAZ8, JAZ10 de *Fragaria* × *ananassa* con sus ortólogos. Alineamiento múltiple de dominio TIFY (A), Jas (B) y análisis filogenético de las secuencias de FaJAZ1, FaJAZ8, FaJAZ10 con sus ortólogos (C). En (B) ‘*’ indica residuos conservados implicados en la interacción con COI1. En (A) y (B) color rojo significa 100% de identidad y variación hacia el azul indica una mayor diversidad de los residuos de aminoácidos. En (B) ‘■’ indica las proteínas JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 de *F. × ananassa*. JAZ, Jasmonate ZIM-domain; NLS, nuclear signal location. FaJAZs, *F. × ananassa* JAZs; FvJAZs; *F. vesca* JAZs; AtJAZs, *A. thaliana* JAZs; MdJAZs, *M. × domestica* JAZs; VvJAZs, *V. vinifera* JAZs; SlJAZs, *S. lycopersicum* JAZs.

4.4.3. La secuencia de degron IPMQRK de FaJAZ1 está conservada en otros miembros de la familia Rosaceae.

Para conocer si la presencia de la nueva secuencia de degron presente en FaJAZ1 y FvJAZ1 es un carácter distintivo del dominio Jas en *F. × ananassa* o, si por el contrario está conservada en otros miembros de la familia Rosaceae, se llevó a cabo un análisis en las proteínas JAZ1 de diversos miembros de la familia de las rosáceas (Fig. 4.3).

En primer lugar, la secuencia de degron IPMQRK presente en FaJAZ1 y FvJAZ1, se utilizó como secuencia ‘query’ para identificar otras posibles proteínas JAZ, con una secuencia idéntica o altamente similar, usando las bases de datos OneKP y GDR. El degron IPMQRK se encontró en varios miembros de la familia Rosaceae como *Fragaria iinumae*, *Rubus occidentalis*, *Rosa palustris* y *Sanguisorba minor* (Fig. 4.3A). Otra secuencia similar, IPQARK se encontró en varias especies del género *Fragaria* como *F. nipponica*, *F. nubicola* y *F. orientalis* (Fig. 4.3A). Sin embargo, en la mayor parte de los miembros de la familia de las rosáceas, la secuencia predominante es LPIARK (Fig. 4.3A). Finalmente, las proteínas JAZ de *F. × ananassa* y del resto de especies (subfamilia Rosoideae) que poseen el degron IPMQRK e IPQARK se agruparon juntas en el grupo I, mientras que las que contienen el dominio LPIAR(R/K) se agruparon en el grupo II (Fig. 4.3B). Estos resultados, indican que el degron IPMQRK está presente únicamente en algunos miembros de la subfamilia Rosoideae (Fig. 4.3B), sugiriendo que la divergencia de esta secuencia es más reciente y específica de la subfamilia Rosoideae.

A

<i>Fragaria x ananassa</i>	I P M Q R K
<i>Fragaria vesca</i>	I P M Q R K
<i>Fragaria iinumae</i>	I P M Q R K
<i>Rosa palustris</i>	I P M Q R K
<i>Rubus occidentalis</i>	I P M Q R K
<i>Sanguisorba minor</i>	I P M Q R K
<i>Fragaria nipponica</i>	I P Q A R K
<i>Fragaria nubicola</i>	I P Q A R K
<i>Fragaria orientalis</i>	I P Q A R K
<i>Amelanchier canadensis</i>	L P L A R K
<i>Aruncus dioicus</i>	L P I A R K
<i>Kerria japonica</i>	L P I A R K
<i>Malus baccata</i>	L P I A R K
<i>Malus x domestica</i>	L P I A R K
<i>Physocarpus opulifolius</i>	L P I A L N
<i>Prunus avium</i>	L P I A R K
<i>Prunus persica</i>	L P I A R K
<i>Prunus prostrata</i>	L P I A R K
<i>Pyrus communis</i>	L P I A R K
<i>Sorbus koehneana</i>	L P I A R K
<i>Dryas octopetala</i>	L P I A R K
<i>Cercocarpus ledifolius</i>	L P I A R K

B

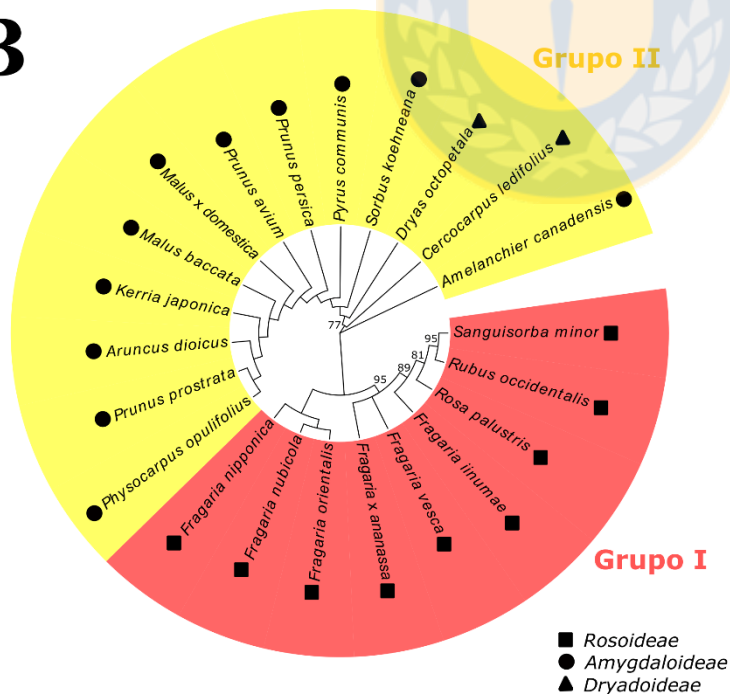


Fig. 4.3. Comparación de las secuencias degron de proteínas JAZ en la familia Rosaceae.
Alineamiento múltiple de la secuencia degron de proteínas JAZ en varias especies de la familia

Rosaceae (A), y análisis filogenético de las secuencias de degron de JAZ en especies de la familia Rosaceae (B). En (A) color rojo significa 100% de identidad y variación hacia el azul indica una mayor diversidad de los residuos de aminoácidos. En (B) ‘■’, ‘●’ y ‘▲’ indican especies de las subfamilias Rosoideae, Amygdaloideae y Dryadoideae, respectivamente.

4.4.4. FaJAZ1 y FaJAZ10 muestran interacción con FaCOI1 mediada por coronatina.

Para evaluar la interacción entre las proteínas FaJAZ1 (degron IPMQRK), FaJAZ8.1 (ausencia de degron) y FaJAZ10 (degron canónico) con el co-receptor FaCOI1, y la funcionalidad del degron IPMQRK de FaJAZ1, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína mediante doble híbrido de levadura (Y2H) en presencia de COR (Fig. 4.4). Además, se estudiaron las interacciones entre las proteínas FaJAZs y el co-receptor AtCOI1, así como las interacciones entre las proteínas AtJAZs y el co-receptor FaCOI1, para comprobar la conservación de la interacción desde un punto de vista evolutivo (Fig. 4.4).

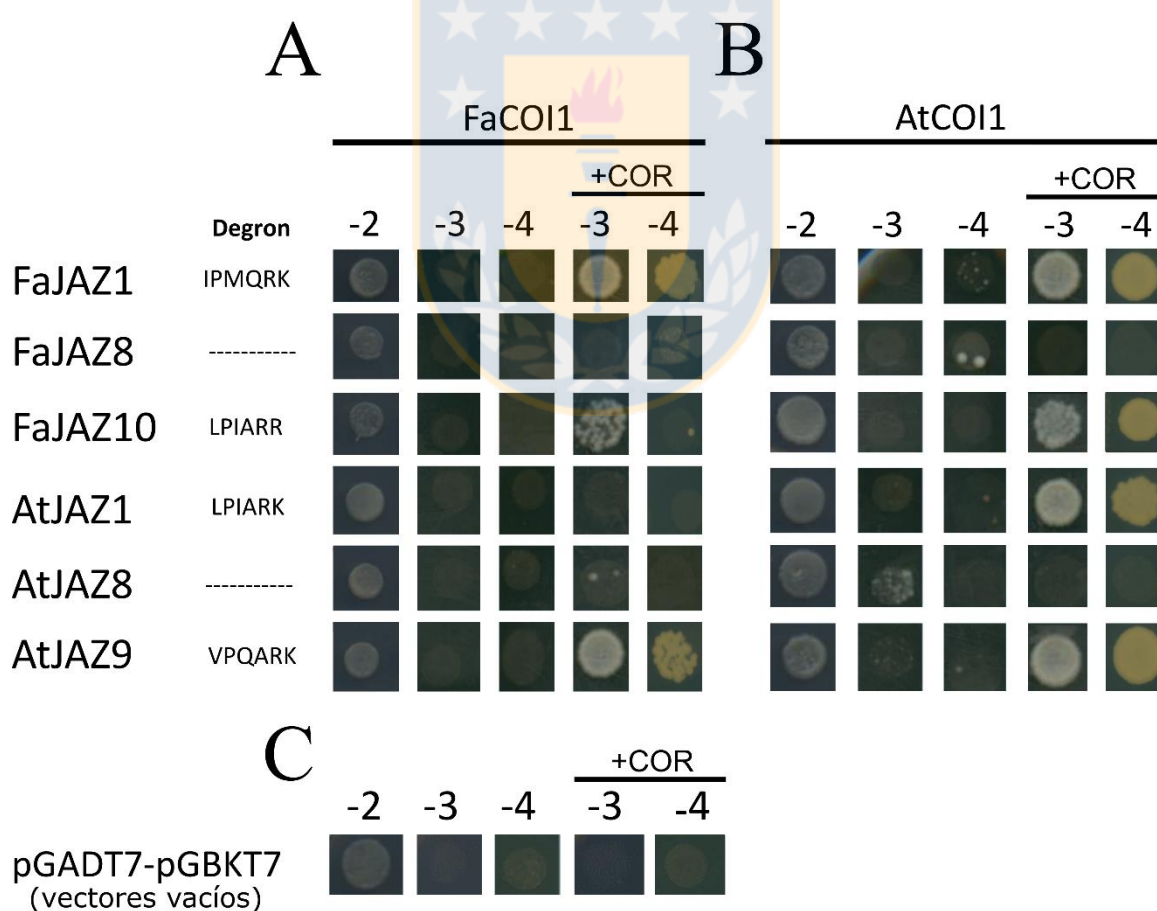


Fig. 4.4. Ensayos de doble híbrido de levadura entre las proteínas JAZs y COI1s en *F. x ananassa* y *A. thaliana*. Interacciones de FaCOI1 (A) y AtCOI1 (B) con las proteínas JAZs de

F. × ananassa y *A. thaliana*, en ausencia y presencia de coronatina (COR). En (C) controles negativos de vectores pGADT7-(AD) y pGBKT7-(DBD) vacíos, en ausencia y presencia de coronatina. -2, SD-Leu-Trp; -3, SD-Leu-Trp-His; -4, SD-Leu-Trp-His-Ade; COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; COR, coronatina; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN.

Los ensayos de Y2H mostraron interacción de FaJAZ1 y FaJAZ10 con FaCOI1 en presencia de coronatina (COR) en medio SD-Leu-Trp-His (-3), sin embargo, para FaJAZ10 no se observó interacción en condiciones más restrictivas del medio de cultivo (SD-Leu-Trp-His-Ade (-4), Fig. 4.4A). Respecto a la interacción de FaJAZs con AtCOI1, se observó interacción de ambas proteínas JAZ con COI1 en los medios suplementados con COR (Fig. 4.4B). Para la interacción entre las proteínas JAZ de *A. thaliana* y el co-receptor COI1 de *F. × ananassa*, se observó interacción únicamente entre AtJAZ9 y FaCOI1 (Fig. 4.4A), mientras que los controles positivos de la interacción AtJAZ1, AtJAZ9 con AtCOI1 mostraron crecimiento de las levaduras (Fig. 4.4B). Por otro lado, FaJAZ8 y AtJAZ8 no interaccionaron con FaCOI1, ni con AtCOI1 bajo ninguna condición (Fig. 4.4A-B). Finalmente, los controles negativos con los vectores destino pGADT7-(AD) y pGBKT7-(DBD) no mostraron activación de los genes reporteros (Fig. 4.4C).

4.5. Discusión.

4.5.1. Conservación de COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 en *F. × ananassa*.

El mecanismo de percepción de JA-Ile es imprescindible para la activación de la vía de señalización y las respuestas a JAs (Chini et al., 2016; Sheard et al., 2010; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017). La proteína COI1 está implicada en los procesos de reproducción (Xie et al., 1998), al igual que en la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis*, ya que los mutantes *coil* muestran una acumulación reducida de estos compuestos (Shan et al., 2009). COI1 forma parte del complejo Skp-Cullin-F-box-type E3 (SCF^{COI1}), está conservada en las plantas terrestres (Han, 2017), y actúa junto con las proteínas represoras JAZ como co-receptor de JA-Ile (Chini et al., 2016; Han, 2017; Sheard et al., 2010; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017). Esta proteína contiene un dominio F-box y varios dominios LRR necesarios para la estabilización de la proteína y la interacción con JAZ1 mediada por JA-Ile (Sheard et al., 2010). Esta estructura de dominios se encontró altamente conservada en *F. vesca* y *F. × ananassa* (Fig. 4.1A). En la percepción del JA-Ile también participa el cofactor InsP₅ (Sheard et al., 2010). En *Arabidopsis*, estos dominios contienen los residuos de

aminoácidos claves para la interacción con JA-Ile, InsP₅ y JAZ1 (Sheard et al., 2010), los cuales estaban 100% conservados en FaCOI1 y se corresponden con los residuos R81, R345, Y383, R406, Y441 y R493 para la interacción con JA-Ile, R81, R345 y R406 para la interacción con InsP₅ y R345, R348, Y469 y R494 para la interacción con JAZ1 (Fig. 4.1A). Los análisis filogenéticos mostraron una relación evolutiva más cercana de las proteínas de FaCOI1 y FvCOI1 entre sí, y también con el MdCOI1 (Fig. 4.1B) de acuerdo a lo esperado, ya que las tres especies pertenecen a la familia de las rosáceas (Xiang et al., 2017). Por el contrario, las proteínas COI1 de especies como *V. vinifera*, *S. lycopersicum* y *A. thaliana* están más alejadas evolutivamente (Fig. 4.1B). Además, AtTIR1 mostró la menor identidad con respecto a FaCOI1 (Tabla S4.5), al igual que una mayor distancia evolutiva ya que es el receptor de auxinas (Dharmasiri et al., 2005; Han, 2017). Estos resultados indicaron que COI1 tiene una alta identidad estructural con AtCOI1 y el resto de ortólogos, y está evolutivamente relacionada con sus ortólogos en *F. vesca* y *M. × domestica*.

Por otro lado, las proteínas JAZ son represores de la vía de señalización de JAs (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), y junto con COI1 son co-receptores de JA-Ile (Chini et al., 2016; Han, 2017; Sheard et al., 2010; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017). En Arabidopsis existen 13 proteínas JAZ, de las cuales JAZ1-JAZ12 contienen los dominios TIFY y Jas conservados (Chini et al., 2016), mientras que JAZ13 contiene únicamente el dominio Jas (Thireault et al., 2015). En otras especies como *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* se han caracterizado 18, 11 y 12 proteínas JAZ, respectivamente (Chini et al., 2017; Li et al., 2015; Zhang et al., 2012). Recientemente, se han identificado y caracterizado 12 proteínas JAZ en *F. vesca* (Garrido-Bigotes et al., 2018), cuyo genoma está representado como un subgenoma en la octoploide *F. × ananassa* (Liu, Poulsen, & Davis, 2016). El dominio Jas está implicado en la interacción con COI1, a través del residuo R (más cercano al C-terminal) de la secuencia de degron LPIARR en JAZ1 de Arabidopsis (Sheard et al., 2010), que se corresponde con el residuo K253 de FaCOI1 y FvCOI1 (Fig. 4.2A). La proteína AtJAZ9 contiene una secuencia de degron alternativa al degron canónico, VPQARK (Garrido-Bigotes et al., 2018), y otras proteínas como AtJAZ7 y AtJAZ8 tienen una secuencia de degron degenerada, que las hace más estables y dificulta su degradación por el proteasoma 26S (Shyu et al., 2012). En *F. vesca* existen secuencias de degron alternativas al degron canónico, como JAZ1 que contiene la secuencia de degron IPMQRK (Garrido-Bigotes et al., 2018), la cual también se encontró conservada en FaJAZ1 (Fig. 4.2A). Por otro lado, FaJAZ8.1 carece del degron (Fig. 4.2A) de acuerdo a su ortólogo en Arabidopsis (Shyu et al., 2012), mientras que FaJAZ10

posee el degron LPIARR (Fig.4.2A). Finalmente, el análisis filogenético mostró una relación cercana de FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 con sus ortólogos en *F. vesca* y *M. × domestica*, sugiriendo una alta conservación de secuencias y un ancestro común en la familia Rosaceae.

4.5.2. Conservación del degron IPMQRK en la familia Rosaceae.

La presencia de la secuencia degron en el dominio Jas es crítica para la percepción de JA-Ile y la interacción de la proteína JAZ con COI1 en Arabidopsis (Sheard et al., 2010). En las proteínas JAZ1 de *F. × ananassa* y *F. vesca* existe el degron IPMQRK conservado (Fig. 4.2A, Garrido-Bigotes et al., 2018). Por otro lado, la familia Rosaceae está constituida por tres subfamilias: Rosoideae que agrupa a géneros como *Fragaria*, *Rubus*, *Rosa*, etc., Amygdaloideae, con representantes de los géneros *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, etc. y una familia minoritaria denominada Dryadoideae (Xiang et al., 2017). La secuencia degron IPMQRK se encontró conservada, únicamente, en algunas especies de la familia Rosoideae como *F. × ananassa*, *F. vesca*, *R. palustris*, *F. iinumae*, *R. occidentalis* y *S. minor* (Fig. 4.3), mientras que otras especies del género *Fragaria* contienen el degron canónico LPIAR(R/K), de forma similar a lo observado en las otras dos subfamilias de las rosáceas (Fig. 4.3A). Estos resultados sugieren que la secuencia degron IPMQRK surgió durante la evolución de las especies de la subfamilia Rosoideae.

4.5.3. Interacciones de COI1 con JAZ1 y JAZ10 de *Fragaria × ananassa*.

El co-receptor COI1 interacciona con JAZ1 mediado por JA-Ile bioactivo (Fonseca et al., 2009; Katsir et al., 2008; Sheard et al., 2010). Por otro lado, la coronatina (COR), análogo estructural y funcional de JA-Ile, también permite la interacción COI1-JAZ en Arabidopsis (Fonseca et al., 2009; Katsir et al., 2008; Melotto et al., 2008). Las proteínas represoras FaJAZ1 y FaJAZ10, las cuales contienen la secuencia degron IPMQRK y LPIARK, respectivamente, interaccionaron con el co-receptor FaCOI1 mediado por COR (Fig. 4.4A), similar a lo reportado para JAZ1 y JAZ9 de *A. thaliana* (Fig. 4.4B, Fonseca et al., (2009); Katsir et al., (2008); Melotto et al., (2008), que contienen el degron LPIARR y VPQARK, respectivamente (Fig. 4.4B, Garrido-Bigotes et al. 2018). En *M. × domestica*, la proteína represora JAZ2 (ortólogo de AtJAZ9) interacciona con MdCOI1 de forma dependiente de COR (An et al., 2017). Por otro lado, el co-receptor AtCOI1 interaccionó con FaJAZ1 y FaJAZ10 en presencia de COR, independientemente de la secuencia degron que estos poseen (Fig. 4.4B), mientras que el co-receptor FaCOI1 únicamente permitió la interacción con AtJAZ9, además de FaJAZ1 (Fig. 4.4A), que poseen secuencias degron alternativas a la canónica (Fig. 3.5A, Garrido-Bigotes

et al., (2018)). Por otra parte, Melotto et al., (2008) observaron que COI1 de *S. lycopersicum* puede interactuar con JAZ1 de *Arabidopsis* en presencia de COR. Finalmente, no se detectaron interacciones de FaJAZ8.1 con FaCOI1 o AtCOI1 en ausencia o presencia de COR (Fig. 4.4A-B), de acuerdo a lo anteriormente reportado para *Arabidopsis*, ya que el ortólogo AtJAZ8 carece de la secuencia de degron conservada (Shyu et al., 2012), necesaria para la interacción COI1-JAZ (Sheard et al., 2010). Estos resultados sugieren que el co-receptor FaCOI1 habría evolucionado hacia una especialización estructural y funcional para la interacción con proteínas JAZ que poseen un degron diferente al degron canónico que poseen las proteínas AtJAZs, sin embargo, investigaciones adicionales serían necesarias para determinar el grado de especificidad de interacción entre FaCOI1 y el resto de proteínas FaJAZs.

4.6. Conclusiones.

Globalmente, se observó una alta conservación de las proteínas COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 en *F. × ananassa*, conjuntamente con sus ortólogos. Curiosamente, FaJAZ1 contiene la secuencia de degron IPMQRK, alternativa a la secuencia de degron canónica (Sheard et al., 2010), observada también en *F. vesca* y otros miembros de la subfamilia Rosoideae. Además, se demostró que la secuencia de degron IPMQRK de FaJAZ1 es funcional para la interacción con FaCOI1, de forma dependiente de COR, sugiriendo una conservación del mecanismo de percepción de los JAs en esta especie.

4.7. Agradecimientos.

Agradecimientos a la Dra. Marcela Torrejón y a los miembros del Laboratorio de Señalización y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad de Concepción, Concepción, Chile), así como al Dr. Roberto Solano y los miembros del Laboratorio de Señalización Hormonal del Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España), por su colaboración y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

4.8. Referencias.

An, X.-H., Hao, Y.-J., Li, E.-M., Xu, K., & Cheng, C.-G. (2017). Functional identification of apple MdJAZ2 in *Arabidopsis* with reduced JA-sensitivity and increased stress tolerance. *Plant Cell Reports*, 36(2), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2077-9>

- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., & Chen, M. (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, *98*(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.05.002>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, Andrea, Ben-Romdhane, W., Hassairi, A., & Aboul-Soud, M. A. M. (2017). Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PLOS ONE*, *12*(6), e0177381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177381>
- Chini, Andrea, Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., & Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *59*(1), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03852.x>
- Chini, Andrea, Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, *435*(7041), 441-445. <https://doi.org/10.1038/nature03543>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N. E., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate signalling pathway in strawberry: Genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening. *PLOS ONE*, *13*(5), e0197118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197118>
- Han, G.-Z. (2017). Evolution of jasmonate biosynthesis and signaling mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, *68*(6), 1323-1331. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw470>
- He, Z., Zhang, H., Gao, S., Lercher, M. J., Chen, W.-H., & Hu, S. (2016). Evolview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, *44*(Web Server issue), W236-W241. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw370>

- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(19), 7100-7105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802332105>
- Li, X., Yin, X., Wang, H., Li, J., Guo, C., Gao, H., ... Wang, X. (2015). Genome-wide identification and analysis of the apple (*Malus × domestica* Borkh.) TIFY gene family. *Tree Genetics & Genomes*, *11*(1), 808. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0808-z>
- Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X., & Tang, K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from taxus and ginkgo. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *34*(3), 209-214. <https://doi.org/10.1081/PB-200026790>
- Liu, B., Poulsen, E. G., & Davis, T. M. (2016). Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids. *Genome*, *59*(2), 79-86. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0116>
- Ma, J., & Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, *51*(1), 113-119.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H. S., Katsir, L., Yao, J., ... He, S. Y. (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *55*(6), 979-988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03566.x>
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, *23*(9), 3089-3100. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089300>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.004>
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>

- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., ... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C. L., Cooke, T. F., Sheard, L. B., Moreno, J. E., ... Howe, G. A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(2), 536-550. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093005>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1079, 105-116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 82(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/tpj.12841>
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science*, 12(6), 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.004>
- 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, Claus, & Song, S. (2017). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303-1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Xiang, Y., Huang, C.-H., Hu, Y., Wen, J., Li, S., Yi, T., ... Ma, H. (2017). Evolution of Rosaceae Fruit Types Based on Nuclear Phylogeny in the Context of Geological Times

and Genome Duplication. *Molecular Biology and Evolution*, 34(2), 262-281.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw242>

Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280(5366), 1091-1094.

Zhang, Y., Gao, M., Singer, S. D., Fei, Z., Wang, H., & Wang, X. (2012). Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape. *PloS One*, 7(9), e44465.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044465>



4.9. Material Suplementario.

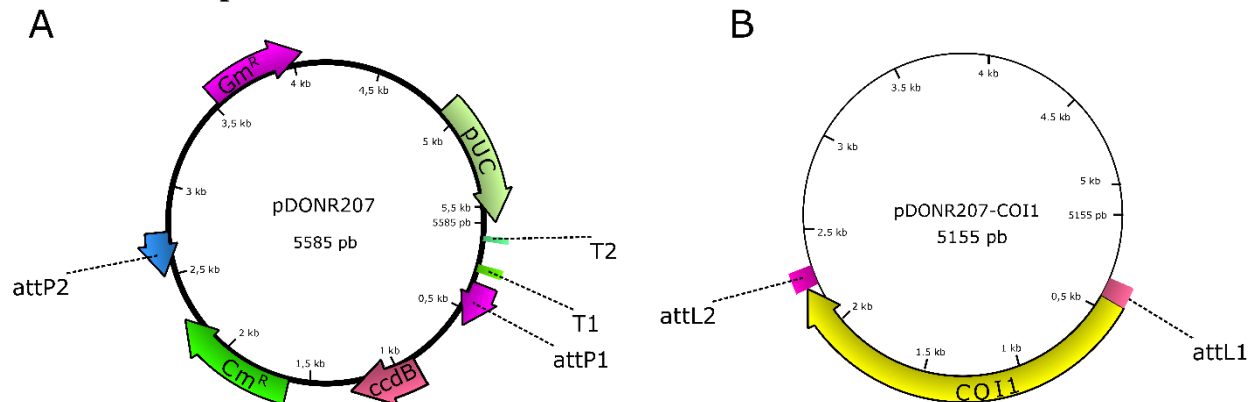


Fig. S4.1. Mapa de vector dador ‘Gateway’ pDONR207 (A) y constructo pDONR207-FaCOI1 (B). Los constructos de FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 fueron creados de igual forma a FaCOI1. $attP1/P2$ y $attL1/L2$: extremos necesarios para la recombinación BP y LR, respectivamente; $ccdB$: gen “suicida”; Cm^R , Gm^R : genes de resistencia a cloranfenicol y gentamicina, respectivamente; pUC, promotor de bacterias; T1 y T2: terminadores de la transcripción en bacterias. Modificado a partir de la información disponible en Gateway Technology (Invitrogen, USA).

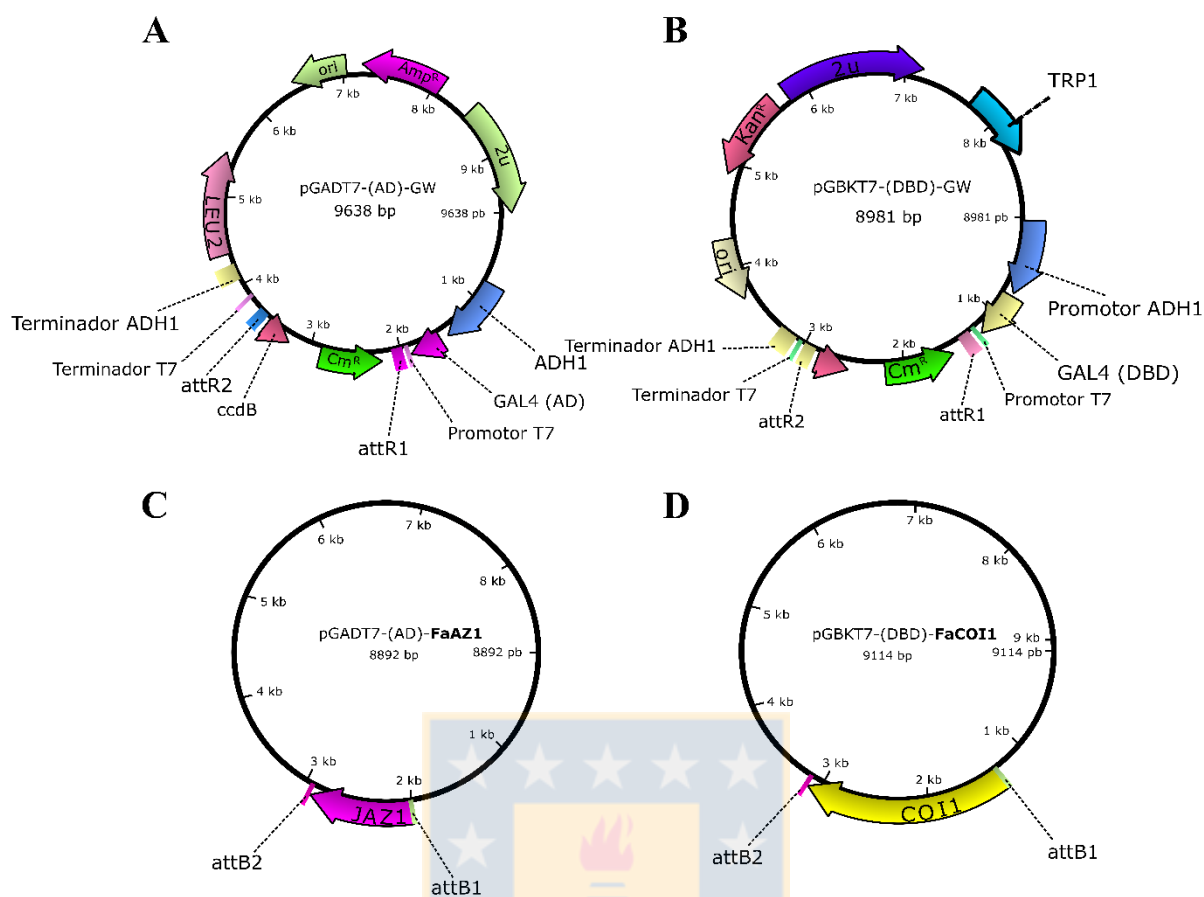


Fig. S4.2. Mapa de vectores destino pGADT7-GW (A) pGBKT7-GW (B) y constructos pGADT7-FaJAZ1 (C) y pGBKT7-FaCOI1 (D). Los constructos de FaJAZ8.1 y FaJAZ10 fueron realizados de igual forma que FaJAZ1. attR1/R2: extremos necesarios para la recombinación LR; attB1/B2, extremos resultantes de la recombinación LR; ccdB: gen “suicida”; Cm^R, Amp^R, Km^R: genes de resistencia a cloranfenicol, ampicilina, y kanamicina, respectivamente; GAL4-AD y GAL4-DBD, dominios de activación y de unión al ADN del activador transcripcional GAL4, respectivamente; LEU2, gen de biosíntesis de leucina; pADH1, promotor ADH1 de levadura; ori y 2 μ : orígenes de replicación en bacterias y levaduras, respectivamente; Terminador ADH1, terminador de la transcripción de levaduras; Terminador T7, terminador de la transcripción de bacterias; TRP1, gen de biosíntesis de triptófano. Elaboración propia a partir de información en las base de datos de vectores de Addgene (<https://www.addgene.org>).

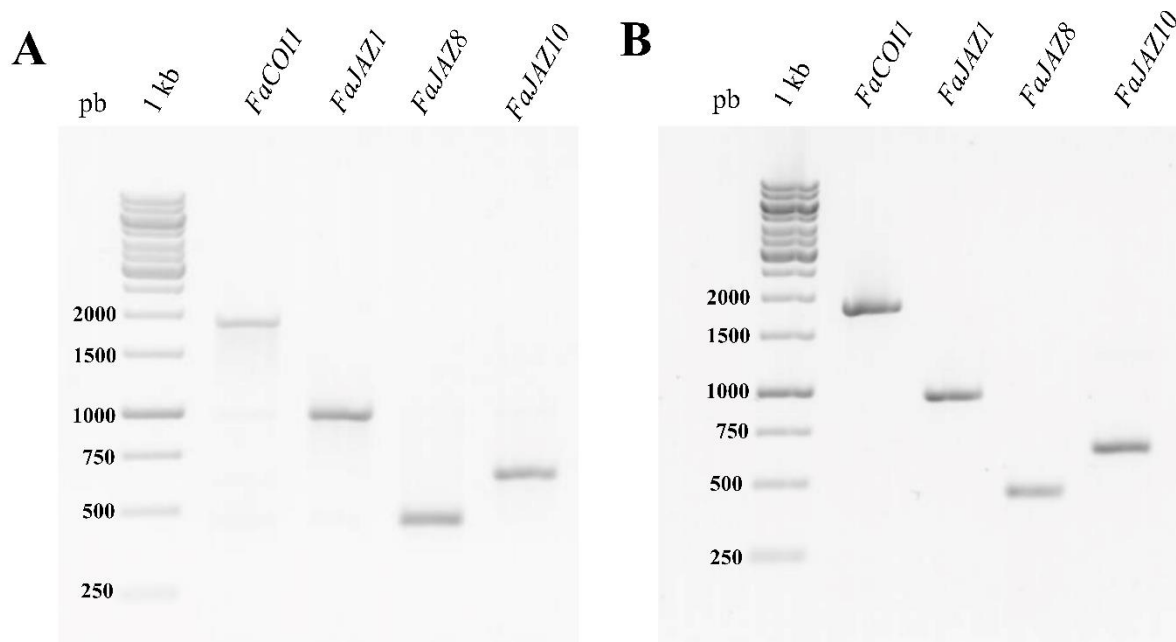


Fig. S4.3. Clonamiento de la región codificante de *FaCOI1*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* con extremos attB1 y attB2 mediante gel de agarosa. Amplificación de secuencias codificantes de *FaCOI1*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* con extremos attB1 y attB2 a partir de ADN complementario, mediante RT-PCR (A) y secuencias codificantes purificadas mediante extracción a partir de gel (B). Gel de agarosa 1% (p/v), condiciones de corrida: 70 V, 45 min. COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; 1 KB, marcador de peso molecular 'Generuler 1KB DNA ladder' (ThermoScientific, USA); pb, pares de bases; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR, Transcripción Reversa-PCR.

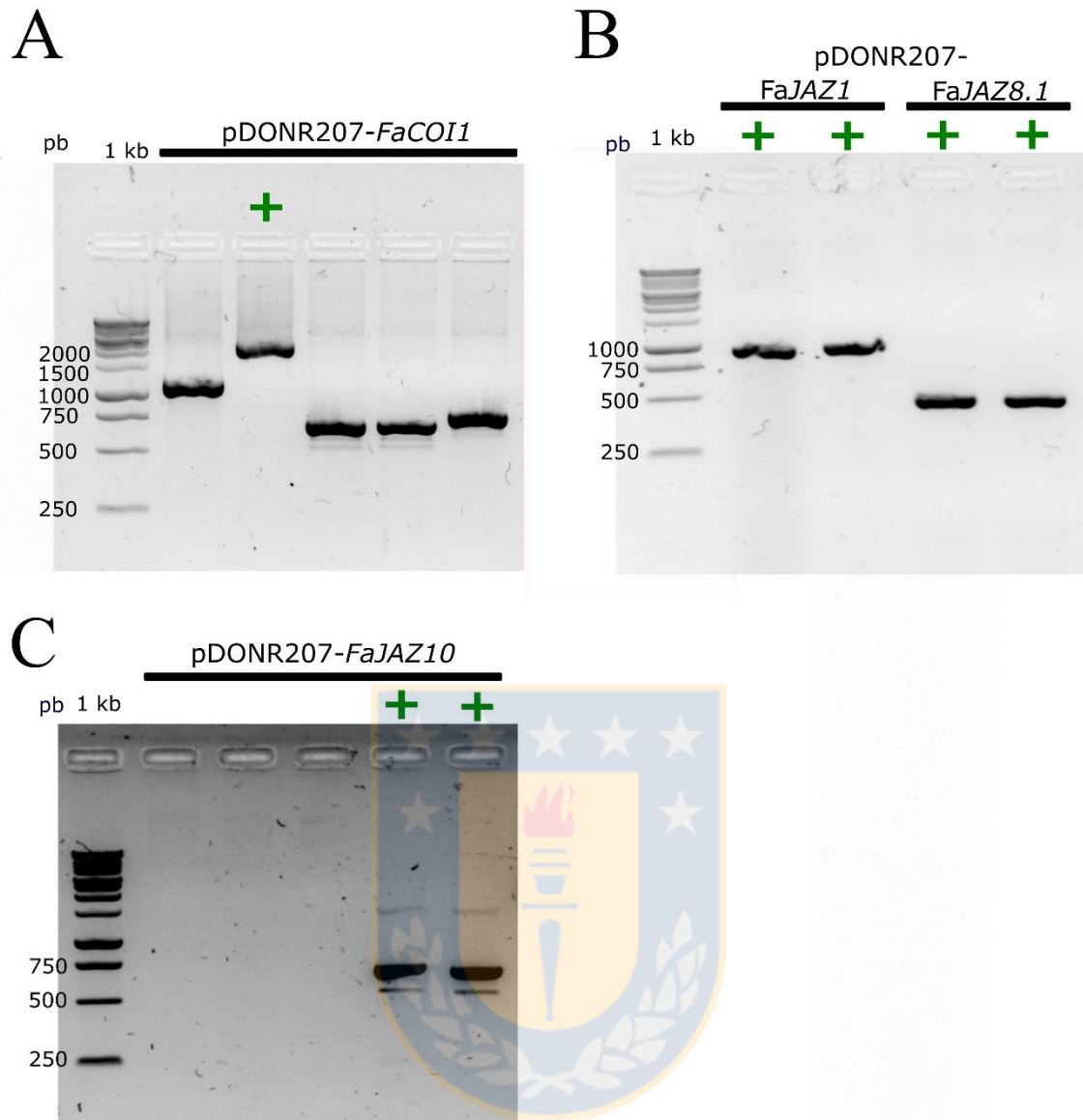


Fig. S4.4. Identificación de clones recombinantes para *FaCOI1*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* recombinadas en el vector dador pDONR207. Análisis mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones pDONR207-*FaCOI1* (A), -*FaJAZ1*, -*FaJAZ8.1* (B) y -*FaJAZ10* (C). Los signos '+' indican los clones positivos. 1 KB, marcador de peso molecular 'Generuler 1KB DNA ladder' (ThermoScientific, USA). COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases, PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

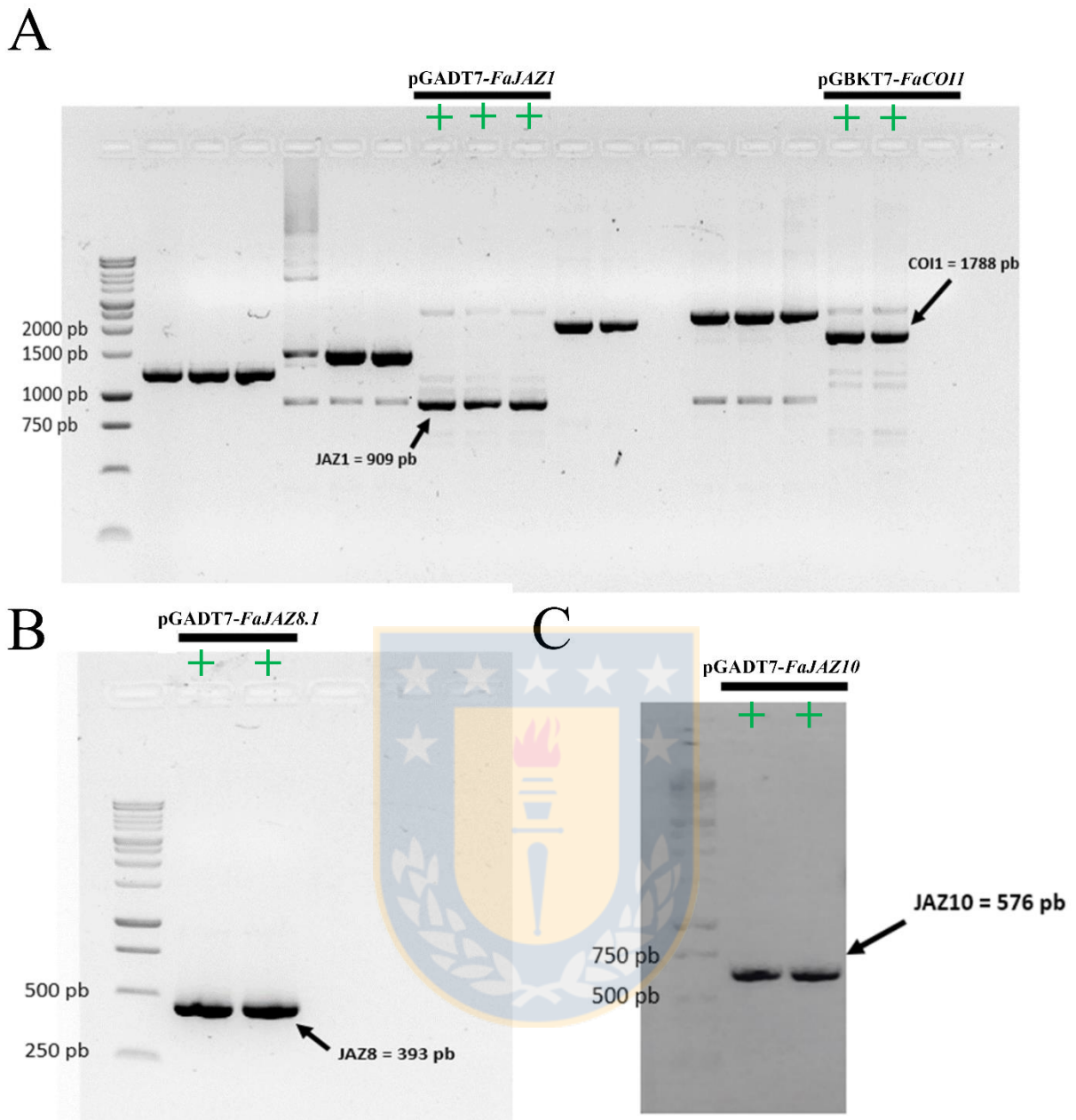


Fig. S4.5. Identificación de clones recombinantes para *FaCOI1*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1* y *FaJAZ10* recombinadas los vectores destino pGADT7-GW y pGBKT7-GW. Análisis mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones pGBKT7-*FaCOI1*, pGADT7-*FaJAZ1* (A), pGADT7-*FaJAZ8.1* (B) y pGADT7-*FaJAZ10* (C). Los signos ‘+’ indican los clones positivos. 1 kb, marcador de peso molecular Generular 1 kb (Invitrogen). COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases, PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla S4.1. Secuencias de primers usados para el aislamiento de las secuencias codificantes de COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 de *Fragaria* × *ananassa*. En rojo y azul se indican los extremos attB1 y attB2, respectivamente, y en negro se indican las regiones específicas de hibridación con la secuencia codificante. attB1/attB2, extremos para la recombinación BP; CDS, secuencia codificante; COI1, CORONATINE-INSENSITIVE 1; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases.

CDS	Tamaño CDS (pb)	attB1 (5'→3')	attB2 (5'→3')	Tamaño total del amplicon (pb)
<i>FaCOI1</i>	1788	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTGATG GAAGATCGAAGCGTC	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCTTATCT GGCATCCCCACTTTGGC CTACGCATTAATCATAGA CTCTTG	1849
<i>FaJAZ1</i>	909	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTGATG TCGAGCTCGTCGG	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCTTATCT GGCATCCCCACTTTGGC T TACTGGGTTGGGAGAGC T	970
<i>FaJAZ8.1</i>	393	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTGATG AGGAGGAACTGCAATTT	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCTTATCT GGCATCCCCACTTTGGC CTAGTGATTGTAGGGATG AGATGT	454
<i>FaJAZ10</i>	576	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTGATG TACACACCCGCCGAG	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCTTATCT GGCATCCCCACTTTGGC TTAGTAGTTGTTGGTGTG ACAACC	637

Tabla S4.2. Condiciones de las reacciones de recombinación con las clonasa BP y LR.

Recombinación BP		Recombinación LR	
attB1-CDS-attB2	150 ng/ μ L	pDONR207-CDS (L1-L2)	150 ng/ μ L
pDONR207 (P1-P2)	150 ng/ μ L	pGADT7/pGBKT7 (R1-R2)	150 ng/ μ L
TE pH 8.0	hasta 10 μ L	TE pH 8.0	hasta 10 μ L
BP clonasa II	2 μ L	LR clonasa II	2 μ L
Volumen total	10 μL	Volumen total	10 μL

Temperatura de reacción: 25 °C. Tiempo de reacción: 18 h.



Tabla S4.3. Números de accesoión de secuencias de COI1 y JAZ de varias especies. COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN.

Proteína	No. accesoión (NCBI)	Secuencia	No. accesoión (NCBI)
FaCOI1	ATD10398	FaJAZ1	ATD10399
FvCOI1	XP_004307613	FvJAZ1	XP_004287655
AtCOI1	NP_565919	AtJAZ1	NP_564075
MdCOI1	XP_008392915	MdJAZ1	XP_008388962
VvCOI1	AFF57759	VvJAZ9	XP_002277157
SICOI1	NP_001234464	SIJAZ1	XP_004243696
AtTIR1	NP_567135	FaJAZ8.1	ATD10400
		FvJAZ8.1	XP_004293626
		AtJAZ8	NP_564349
		MdJAZ3	XP_008371611
		MdJAZ4	XP_008371611
		VvJAZ3	XP_003634826
		SIJAZ10	XP_004244919
		FaJAZ10	ATD10401
		FvJAZ10	XP_004310129
		AtJAZ10	NP_001154713
		MdJAZ13	MDP0000244580 ¹
		MdJAZ14	MDP0000243322 ¹
		VvJAZ2	XP_002262750
		SIJAZ11	XP_004244921

¹Número de acceso en base de datos ‘Genome Database for Rosaceae (GDR)’ (<https://www.rosaceae.org/>).

Tabla S4.4. Números de accesoión de secuencias de las bases de datos ‘OneKP’ y ‘GDR’ usadas en los análisis de las secuencias ‘degron’.

Especie	No. Accesoión GDR¹	Especie	No. Accesoión OneKP²
<i>Fragaria iinumae</i>	FII_iscf00051812.1.g00001.1	<i>Amelanchier canadiensis</i>	EAVM-2012760
<i>Fragaria nipponica</i>	FNI_iscf00055213.1.g00003.1	<i>Aruncus dioicus</i>	ZPKK-2035046
<i>Fragaria nubicola</i>	FNU_iscf00000067.1.g00001.1	<i>Cercocarpus ledifolius</i>	XFFT-2008340
<i>Fragaria orientalis</i>	FOR_icon10232751.1.g00001.1	<i>Dryas octopetala</i>	SQCF-2048965
<i>Malus</i> × <i>domestica</i>	MD15G1220400	<i>Kerria japonica</i>	TJQY-2055175
<i>Prunus avium</i>	Pav_sc0000129.1g1420.1.mk	<i>Malus baccata</i>	VCIN-2079435
<i>Prunus persica</i>	ppa009778m	<i>Physocarpus opulifolius</i>	SXCE-2002542
<i>Pyrus communis</i>	PCP022157.1	<i>Prunus prostrata</i>	NCVK-2008786
<i>Rubus occidentalis</i>	Bras_G03023	<i>Rosa palustris</i>	IANR-2000625
		<i>Sanguisorba minor</i>	QNOC-2003302
		<i>Sorbus koehneana</i>	BLVL-2000460

¹GDR, Genome Database For Rosaceae (<https://www.rosaceae.org/>).

²OneKP, 1000 plants (<https://onekp.com/>).

Tabla S4.5. Identidad de las secuencias de proteínas FaCOI1, FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ10 con sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre COI1, JAZ1, JAZ8.1 y JAZ10 de *Fragaria × ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinífera* y *S. lycopersicum*, y con TIR1. FaCOI1, *Fragaria × ananassa* COI1; FvCOI1, *Fragaria vesca* COI1; AtCOI1, *Arabidopsis thaliana* COI1; MdCOI1, *Malus × domestica* COI1; VvCOI1, *Vitis vinifera* COI1; SlCOI1, *Solanum lycopersicum* COI1; AtTIR1, *Arabidopsis thaliana* TIR1.

	FaCOI1	FaJAZ1	FaJAZ8.1	FaJAZ10
FvCOI1	98,6	---	---	---
AtCOI1	69,6	---	---	---
MdCOI1	81,7	---	---	---
VvCOI1	77,1	---	---	---
SlCOI1	71,6	---	---	---
AtTIR1	34,1	---	---	---
FvJAZ1	---	99,0	---	---
AtJAZ1	---	38,8	---	---
MdJAZ1	---	58,7	---	---
VvJAZ9	---	45,7	---	---
SlJAZ1	---	39,6	---	---
FvJAZ8.1	---	---	100	---
AtJAZ8	---	---	45,9	---
MdJAZ3	---	---	66,4	---
MdJAZ4	---	---	66,4	---
VvJAZ3	---	---	61,1	---
SlJAZ10	---	---	54,5	---
FvJAZ10	---	---	---	94,3
AtJAZ10	---	---	---	36,5
MdJAZ13	---	---	---	27,3
MdJAZ14	---	---	---	27,3
VvJAZ2	---	---	---	42,3
SlJAZ11	---	---	---	29,7

Capítulo 5:

Los represores JAZ de *Fragaria* × *ananassa* participarían en la regulación la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína

Garrido-Bigotes, A., Solano, R., Torrejón, M. & Figueroa, C. “Los represores JAZ de *Fragaria* × *ananassa* participarían en la regulación la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW mediante interacciones proteína-proteína”. (En preparación).

5.1. Resumen.

Los jasmonatos (JAs) controlan la acumulación de proantocianidinas (PAs) y antocianinas en *Arabidopsis*, y en *F. × ananassa* también se han propuesto como reguladores de la acumulación de estos compuestos flavonoides. La vía de señalización de los JAs y concretamente los represores JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) son los que controlan la activación de la vía de señalización de JAs, mediante interacción con los factores de transcripción (FTs) MYC2, y además, regulan los FTs del complejo MBW en *Arabidopsis*. En *F. × ananassa* el rol regulador de las proteínas JAZ es desconocido. El objetivo de esta investigación fue evaluar las interacciones de los represores FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 con los componentes centrales de la vía de señalización de los JAs y con los FTs del complejo MBW que regulan la biosíntesis de PAs y antocianinas en *F. × ananassa*. Para ello, se aislaron las secuencias codificantes (CDS) de FaJAZ9, FaNINJA, FaMYC2, FaJAM1, FabHLH3, FabHLH33 y FaMYB10. Se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias de aminoácidos y se compararon con los ortólogos en *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum*. Por otro lado, las CDS fueron clonadas en vectores de expresión de levaduras mediante tecnología “Gateway”, para la evaluación de interacciones proteína-proteína mediante doble híbrido de levadura (Y2H). Los componentes de la vía de señalización de los JAs mostraron una alta conservación a nivel de dominios estructurales, al igual que los FTs de complejo MBW. Mediante los ensayos Y2H se observó conservación funcional de la interacción de FaJAZs con los componentes de la vía de señalización de los JAs, y con los FTs bHLH y MYB que regulan la acumulación de PAs y antocianinas. Globalmente, de acuerdo a lo observado anteriormente en *Arabidopsis* y *M. × domestica*, los resultados sugieren que las proteínas JAZ son reguladores negativos de la vía de transducción de señales de los JAs y de los FTs del complejo MBW implicado en la biosíntesis de PAs y antocianinas en *F. × ananassa*.

5.2. Introducción.

Los jasmonatos (JAs) controlan respuestas a estrés biótico, abiótico, desarrollo y metabolismo (Huang et al., 2016; Wasternack & Hause, 2013; Wasternack, 2014; Yuan & Zhang, 2015). El ácido abscísico (ABA) es el principal regulador de la maduración de frutilla, y se relaciona con la acumulación de antocianinas en frutos (Chai, Jia, Li, Dong, & Shen, 2011; Jia et al., 2011, 2013, 2016; Jiang & Joyce, 2003), pero en la planta modelo *Arabidopsis* los JAs inducen la acumulación de antocianinas, regulando enzimas de la ruta de biosíntesis de los flavonoides (Shan, Zhang, Peng, Wang, & Xie, 2009). El rol de los JAs en la acumulación y biosíntesis de antocianinas en especies como la frutilla aún no ha sido elucidado. Recientemente, Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, (2018) reportaron altos niveles de JA-Ile en estadios de flor y verdes, y una disminución de los niveles de JAs durante el desarrollo y hacia la maduración de los frutos. Por otro lado, el tratamiento con MeJA de frutos de *F. chiloensis* y *F. × ananassa* induce cambios de coloración y un incremento en el contenido de antocianinas (Concha et al., 2013; Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018a), junto con una disminución en los niveles de ABA y la expresión del gen que codifica para el enzima 9-*cis*-epoxycarotenoide dioxigenasa 1 (*NCEDI*; Garrido-Bigotes et al., 2018a), que regula la biosíntesis de ABA en frutilla (Jia et al., 2016).

La activación de la vía de señalización de los JAs permite responder a estímulos ambientales o endógenos para llevar a cabo una reprogramación genética y fisiológica mediada por factores de transcripción (FTs) en *Arabidopsis* (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016; Goossens, Mertens, Goossens, & Napier, 2017; C. Wasternack & Hause, 2013; Claus Wasternack, 2014; Claus Wasternack & Song, 2017). Las respuestas comienzan con un aumento en los niveles de JA bioactivo (JA-Ile) (Andrea Chini et al., 2016; Fonseca et al., 2009; C. Wasternack & Hause, 2013; Claus Wasternack, 2014; Claus Wasternack & Song, 2017), el cual es reconocido por el co-receptor COI1 permitiendo la unión de los represores transcripcionales JAZ (Cui, Du, & Yao, 2018; Sheard et al., 2010) para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S (Chini et al., 2007; Chini et al., 2016; Thines et al., 2007). La degradación de los represores JAZ libera la unión de estas proteínas a los FTs MYC2, que permite la unión a regiones promotoras G-box y activación de la expresión de los genes de respuesta a JAs (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012, 2015).

Las proteínas JAZ, pertenecen a la familia TIFY que se localizan en el núcleo (Bai, Meng, Huang, Qi, & Chen, 2011; Vanholme, Grunewald, Bateman, Kohchi, & Gheysen, 2007), y ejercen funciones reguladoras sobre un amplio espectro de factores de transcripción,

relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios como los antocianinas (Fernández-Calvo et al., 2011; Goossens et al., 2017; Qi et al., 2011). En *Arabidopsis thaliana* han sido estudiados en profundidad la estructura y rol de las proteínas JAZ (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Vanholme et al., 2007), sin embargo, en otras especies como *F. vesca*, *F. × ananassa*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum*, únicamente han sido caracterizadas a nivel molecular, y ha sido estudiada su expresión durante el desarrollo y frente a diversos tipos de estrés (Andrea Chini, Ben-Romdhane, Hassairi, & Aboul-Soud, 2017; Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, & Figueroa, 2018b; Li et al., 2015; Zhang et al., 2012). En su secuencia de aminoácidos, contienen el dominio TIFY (ZIM; Vanholme et al., 2007), que media la interacción con la proteína NINJA para formar el complejo represor de los FTs (Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011), y al mismo tiempo permite la formación de homo- y heterodímeros entre las proteínas JAZ (Chini, Fonseca, Chico, Fernández-Calvo, & Solano, 2009). En el extremo carboxilo terminal presenta el dominio conservado Jas, que es el encargado de unirse a regiones conservadas de los FTs, ejerciendo así su rol represor (Fernández-Calvo et al., 2011; Goossens et al., 2017; Pauwels & Goossens, 2011), el cual tiene la secuencia conservada S-L-X₂-F-X₂-K-R-X₂-R y X₅PY, que actúan como dominio de unión a los FTs y señal de localización nuclear (NLS), respectivamente (Grunewald et al., 2009; Pauwels & Goossens, 2011).

En la vía de señalización de los JAs existen varios FTs que son dianas moleculares de las proteínas JAZ, como los FTs tipo MYC (Fernández-Calvo et al., 2011; Goossens et al., 2017; Pauwels & Goossens, 2011), los cuales se han asociado a la acumulación de antocianinas (Dombrecht et al., 2007; Lorenzo, Chico, Sánchez-Serrano, & Solano, 2004). Los MYCs presentan en su extremo amino terminal el dominio JAZ INTERACTOR DOMAIN (JID) que interacciona con el dominio Jas de los represores JAZ (Fernández-Calvo et al., 2011). Además, las proteínas antagonistas JASMONATES-ASSOCIATED MYC2-like (JAMs), inhiben la acumulación de antocianinas (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), y presentan el dominio JID conservado en *F. vesca* (Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, et al., 2018b) y en *Arabidopsis*, donde se ha evaluado su interacción con las proteínas JAZ (Fonseca et al., 2014).

Además, los represores transcripcionales JAZ tienen como dianas moleculares diversos FTs implicados en el control de la biosíntesis de estos compuestos (Goossens et al., 2017; Qi et al., 2011). En *Arabidopsis* las proteínas JAZ interaccionan con TT8, EGL3 y MYB75 (PAP1) (Qi et al., 2011), correspondientes a los ortólogos bHLH3, bHLH33 y MYB10 de *F. vesca* y *F.*

× *ananassa*, los cuales pertenecen al complejo MBW y regulan con la biosíntesis de proantocianidinas (PAs) y antocianinas (Lin-Wang et al., 2010; Schaart et al., 2013). En *M. × domestica*, se ha reportado la interacción de MdJAZ2, MdJAZ3 y MdJAZ8 con bHLH3 sin embargo, las proteínas JAZ no interactúan con FTs tipo MYB del complejo MBW como MdMYB9 y MdMYB11 (An et al., 2015). La interacción entre los FTs tipo bHLH (TT8, EGL3) y MYB75 con las proteínas represoras JAZ está mediada por el dominio bHLH y el dominio carboxilo terminal (CT) con el dominio de interacción Jas, respectivamente (Goossens et al., 2017; Qi et al., 2011).

El objetivo de esta investigación fue determinar, la conservación funcional de las interacciones proteína-proteína de los represores JAZ con los componentes de la vía de señalización de los JAs (NINJA, MYC2 y JAM1) y los FTs del complejo MBW (bHLH3, bHLH33 y MYB10) encargado de la biosíntesis de PAs y antocianinas.

5.3. Material y Métodos.

5.3.1. Material Vegetal.

Las flores y los frutos de *Fragaria × ananassa* cv. Aromas fueron cosechados en un campo de Angol, Región de la Araucanía, Chile (latitud 37°45'18"S; longitud 72°36'49"O), y fueron transportados al laboratorio en condiciones de refrigeración. Posteriormente, los frutos fueron clasificados en diferentes estadios de desarrollo: verde pequeño (SG), verde grande (LG), blanco (W), transición (T), 50% maduro (50%R) y 100% maduro (R), que se corresponden con 10, 17, 20, 21, 23 y 25 días post-antesis, respectivamente.

5.3.2. Extracción de ARN y Síntesis de ADN complementario.

El ARN total fue extraído a partir de cada estadio de desarrollo de las flores y los frutos de *F. × ananassa* cv. Aromas, usando el método CTAB con modificaciones (Liao et al., 2004) y el kit de extracción por columna 'RNeasy Plus Mini Kit' (Qiagen, Alemania). La integridad del ARN se evaluó mediante gel de agarosa y las muestras de ARN se cuantificaron mediante Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, USA). Posteriormente, se realizó la síntesis de ADN complementario a partir de 1 µg de ARN total usando kit 'RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit' (ThermoScientific, USA). La integridad del ADN complementario se verificó mediante RT-PCR.

5.3.3. Amplificación de secuencias codificantes.

Las secuencias codificantes (CDS) de *JAZ9*, *NINJA*, *MYC2*, *JAM1* (Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, et al., 2018b) de *F. vesca* y las CDS de *bHLH3*, *bHLH33* y *MYB10* de *F. × ananassa* (Lin-Wang et al., 2010; Schaart et al., 2013), se usaron como templado para el diseño de primers, a los que se les agregaron los extremos attB1 y attB2 a los extremos 5' y 3' de la CDS, respectivamente, usados para la clonación mediante la tecnología 'Gateway' (Invitrogen, USA) (Tabla S5.1). Los aislamientos de las CDS se realizaron a partir de un mix de ADN complementario de los 7 estadios de desarrollo. La amplificación se realizó mediante PCR semicuantitativa, usando la ADN polimerasa de alta fidelidad 'Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase' (ThermoScientific, USA), y los productos de la misma se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: denaturación inicial a 98 °C, 30 s; 35 ciclos de denaturación a 98 °C, 10 s, annealing a 58 °C, 30 s, y extensión a 72 °C, 30 s /kb; extensión final a 72 °C, 10 min. A continuación, los productos de la amplificación se verificaron y purificaron a partir del gel de agarosa, con el kit 'Zymoclean Gel DNA Recovery Kit' (ZymoResearch, USA). Finalmente, los productos purificados se cuantificaron usando el nanofotómetro 'Nanophotometer P-300' (Implen, Alemania) y la integridad de los mismos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

5.3.4. Clonación de secuencias codificantes mediante recombinación 'Gateway'.

Las secuencias attB1-CDS-attB2 de *MYC2*, *NINJA*, *JAM1*, *JAZ9*, *bHLH3*, *bHLH33* y *MYB10* se clonaron mediante tecnología 'Gateway' en el vector dador pDONR207-GW (Fig. S5.1A), usando la recombinasa 'Gateway BP Clonase II Enzyme Mix' (Invitrogen, USA). A continuación, bacterias de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes se transformaron con 5 µL de la reacción de recombinación BP y se plaquearon en medio LB semisólido con antibiótico gentamicina (2,5 µg/mL). Las bacterias se incubaron 12-16 h hasta la aparición de colonias. La recombinación de las CDS en el vector dador se verificó mediante PCR de colonias, usando *Taq* polimerasa recombinante (Fermentas), con las condiciones indicadas por el fabricante. Los clones positivos se crecieron en medio LB líquido con antibiótico gentamicina durante 16 h, y las construcciones de cada CDS en el vector dador pDONR207 (Fig. S5.1A) fueron purificadas por miniprep mediante el kit 'PureYield Plasmid Miniprep System' (Promega, USA). Las construcciones se secuenciaron mediante secuenciación Sanger (Macrogen Inc, Korea del Sur). Posteriormente, las CDS se tradujeron a proteína mediante el software EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

Las construcciones de los FTs en pDONR207-GW se recombinaron en el vector destino pGADT7-GW (Fig. S5.1B), mientras que las construcciones de las CDS de JAZs en pDONR207-GW se recombinaron en el vector destino pGBKT7 (Fig. S5.1C), usando la recombinasa ‘Gateway LR Clonase II Enzyme Mix’ (Invitrogen, USA). Posteriormente, 5 μ l de reacción de recombinación LR se usaron para transformar bacterias de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes, y estas se plaquearon en medio LB semisólido con antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) para crecer los transformantes con pGADT7, y kanamicina (2,5 μ g/mL) para los transformantes de pGBKT7. Las bacterias se incubaron 12-16 h hasta la aparición de colonias. La recombinación de las CDS en el vector dador se verificó mediante PCR de colonias, usando *Taq* polimerasa recombinante (Fermentas), con las condiciones indicadas por el fabricante. Los clones positivos se crecieron en medio LB líquido con antibiótico ampicilina o kanamicina. Posteriormente, las construcciones en pGADT7 y pGBKT7 (Fig. S5.1B-C) se purificaron por miniprep mediante el kit ‘PureYield Plasmid Miniprep System’ (Promega, USA), y se verificaron mediante RT-PCR. Las construcciones en los vectores destino se usaron para los ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H).

5.3.5. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético.

Las secuencias de aminoácidos de *F. × ananassa*, y los ortólogos de *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* se emplearon para los análisis de secuencias mediante alineamiento múltiple y análisis filogenético. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el software Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) y se visualizaron con el software Jalview (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009). Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método basado en distancias ‘Neighbor-Joining’, con un bootstrap de 1000 réplicas, usando software ‘CLC Sequence Viewer v8.0’ (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) y se visualizaron con el software Evolview (He et al., 2016). Los números de acceso de las secuencias empleadas en los análisis se indican en la Tabla S5.2.

5.3.6. Ensayos de Doble Híbrido de Levadura (Y2H)

5.3.6.1. Cepa de levadura.

La levadura empleada en los análisis fue *Saccharomyces cerevisiae* AH109 cuyo genotipo es (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ), la cual

contiene TRP y LEU como marcadores de selección, e HIS3, ADE2 y LacZ como genes reporteros (Takara, USA).

5.3.6.2. Transformación de levaduras.

La cepa de *S. cerevisiae* AH109 se creció en medio YPD/agar (BD, USA) suplementado con adenina (0,02% p/v) e se incubó durante 2 días a 30 °C hasta el crecimiento de colonias aisladas. Posteriormente, 50 mL de medio líquido YPD (BD, USA) suplementado con adenina (0,02% p/v, YPDA) se inocularon con una colonia aislada y se incubaron a 30°C, en agitación (250 rpm) durante 16 h, constituyendo el preinóculo. A continuación, 200 mL de medio líquido YPDA se inocularon con 6-8 mL de preinóculo hasta una OD₆₀₀ de 0,2-0,3. El cultivo se incubó a 30 °C durante 3-4 h hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-0,7. Posteriormente, los 200 mL de cultivo se transfirieron a tubos de centrifuga estériles de 50 mL, y centrifugados a 2200 rpm, 4 °C durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con 50 ml de agua nanopura estéril y se centrifugó a 2200 rpm, 4 °C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron las células en 1 mL de agua nanopura estéril, se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 400 mL de una solución de acetato de litio 10X, Tris-EDTA 10X y agua nanopura estéril. Se utilizaron 50 µL de células para las co-transformaciones.

En cada co-transformación se emplearon 300 ng de cada constructo pGADT7-(AD)-X y pGBKT7-(DBD)-Y previamente clonados (ver sección 5.3.4, siendo X las secuencias codificantes de *FaNINJA*, *FaMYC2*, *FaJAM1*, *FabHLH3*, *FabHLH33* y *FaMYB10*, e Y las secuencias codificantes de *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1*, *FaJAZ9* y *FaJAZ10*. También fueron realizadas co-transformaciones de los vectores pGADT7-(AD) y pGBKT7-(DBD) vacíos, así como co-transformaciones con pGADT7-(AD) vacío y pGBKT7-(DBD)-JAZs, o pGADT7-(AD)-FTs y pGBKT7-(DBD) vacío, como controles negativos. Para cada una de las co-transformaciones se mezclaron 300 ng de cada constructo, 10 µL de esperma de salmón (ADN 'carrier') y 50 µL de células en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL. Posteriormente, se agregaron 600 µL de una solución de acetato de litio 10X, Tris-EDTA 10X y polietilenglicol al 50% p/v. Se mezcló mediante vórtex y se incubó a 37 °C, en agitación durante 30 min. A continuación, se agregaron 70 µL de DMSO estéril a cada tubo, y se sometieron a estrés térmico a 42 °C durante 15 min. Las células se recuperaron en hielo durante 2 min y se centrifugaron a 11000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µL de agua nanopura estéril. Posteriormente, las células se sembraron en medio sintético definido (SD, Takara) suplementado con adenina (0,02% p/v), histidina (0,02% p/v) y drop-out (-Ade-His-Leu-Trp),

para la selección de los transformantes, en ausencia de Leu y Trp. Las placas se incubaron durante 2-3 días hasta la aparición de colonias transformantes.

5.3.6.3. Evaluación de las interacciones JAZs-TFs.

Las interacciones proteína-proteína entre las proteínas JAZ y los factores de transcripción MYC2 y JAM1 de la vía de señalización de los JAs, junto los factores de transcripción bHLH3, bHLH33, MYB10 y MYB1 del complejo MBW se evaluaron por la técnica Y2H, mediante la activación de los genes reporteros *ADE*, *HIS* y *lacZ* presentes en la cepa AH109 de *S. cerevisiae*.

Las colonias transformantes se resuspendieron en agua nano pura estéril. Se hicieron diluciones 1:10 para medir la OD₆₀₀ inicial, la cual se ajustó a una OD₆₀₀ final de 1. A continuación, las interacciones se evaluaron en medio sintético definido (SD) para el crecimiento de levaduras, con diferentes auxotrofías: SD-Leu-Trp (-2), SD-Leu-Trp-His (-3), SD-Leu-Trp-His-Ade (-4). Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días.

Para evaluar la activación del gen reportero *lacZ* se realizó el ensayo de la actividad β-galactosidasa. Las colonias crecidas en medio SD-Leu-Trp se transfirieron a una membrana de nylon, y se sumergieron en nitrógeno líquido 3 veces, durante 10 s. A continuación, la membrana con las células hacia arriba se colocó sobre papel Whatman, previamente humedecido con una solución que contenía buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0), β-mercaptoetanol y X-gal (20 mg/mL). Finalmente, se incubaron a 30 °C durante 24 h para observar la coloración de las colonias.

5.4. Resultados.

5.4.1. Aislamiento y clonación de las secuencias codificantes de *Fragaria* × *ananassa*.

Las secuencias codificantes (CDS) de *NINJA*, *MYC2*, *JAM1*, *JAZ9* de *F. vesca* y las CDS de *bHLH3*, *bHLH33* y *MYB10* de *F. × ananassa* se usaron como templado para el diseño de primers y aislamiento en *F. × ananassa*. Posteriormente, se amplificaron las secuencias a partir de ADN complementario, y se obtuvieron bandas de amplificación correspondientes a los tamaños de cada secuencia, junto con las secuencias attBs de los extremos (Fig. S5.2), indicados en la Tabla S5.1 para cada una de las secuencias amplificadas. A continuación, los productos obtenidos se purificaron y se verificó la integridad de los mismos mediante gel de agarosa (Fig. S5.3). Posteriormente, las CDS junto con las secuencias attBs de los extremos fueron recombinadas, mediante recombinación BP, en el vector dador pDONR207-GW, y células de *E. coli* quimiocompetentes se transformaron, obteniéndose colonias recombinantes,

las cuales se analizaron individualmente mediante PCR de colonias, para encontrar los clones positivos de cada una de las secuencias anteriormente mencionadas (Fig. S5.4). A partir de las colonias positivas (Fig. S5.4), se realizó la purificación de cada una de las construcciones, y las muestras se enviaron a Macrogen Inc. para secuenciación Sanger.

Tras el análisis de los resultados de secuenciación, las secuencias correspondientes a FabHLH3, FabHLH33 y FaMYB10 fueron consideradas nuevas isoformas, ya que difirieron en las secuencias codificantes y/o secuencias de aminoácidos anteriormente reportadas (Schaart et al. 2013, Lin-Wang et al. 2010), y nombradas como FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2, de acuerdo a las normas de nomenclatura propuestas por Jung et al. (2015). A continuación, se realizaron las recombinaciones LR entre pDONR207-*FaJAZ1/8.1/9/10* y el vector destino pGBKT7-(DBD), y pDONR207-*FaNINJA/MYC2/JAM1/bHLH3/bHLH33/MYB10* con el vector destino pGBKT7-(AD) (Fig. S5.1B-C). A continuación, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes y se obtuvieron colonias recombinantes. A continuación, las colonias recombinantes se verificaron mediante PCR de colonias, obteniéndose colonias positivas de todas las CDS recombinadas (Fig. S5.5). A continuación, las construcciones se purificaron mediante miniprep para su uso en los ensayos de Y2H.

5.4.2. Conservación de las secuencias de aminoácidos de NINJA, MYCs, JAMs y JAZ9 en *Fragaria* × *ananassa*.

Se realizó un análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína adaptadora NINJA, el FT MYCs, el antagonista JAMs y la proteína represora JAZ9 para evaluar la conservación de dominios en *F. × ananassa*, de acuerdo a sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* (Figs. 5.1-5.4).

El alineamiento múltiple de la proteína NINJA de *F. × ananassa* con sus ortólogos mostró una alta conservación del dominio “Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression” (EAR) (Fig. 5.1A). Por otro lado, la secuencia del extremo carboxilo terminal, correspondiente al dominio C, presentó un alta conservación en *F. × ananassa* de residuos de aminoácidos (Fig. 5.1B). La proteína NINJA de *F. × ananassa* presentó la mayor identidad con sus ortólogos en *F. vesca* (96,19%) y *M. × domestica* (77,46%), seguido de *V. vinifera* (65,59%), *S. lycopersicum* (56,62%) y, finalmente, *A. thaliana* (54,41%) (Tabla S5.3). El análisis filogenético indicó una relación evolutiva cercana entre NINJA de *F. × ananassa*, *F. vesca* y *M. × domestica* que se agruparon juntos en el grupo II, mientras que los ortólogos de *V. vinifera*, *S. lycopersicum* y *A. thaliana* se agruparon en el grupo I (Fig. S5.1C).

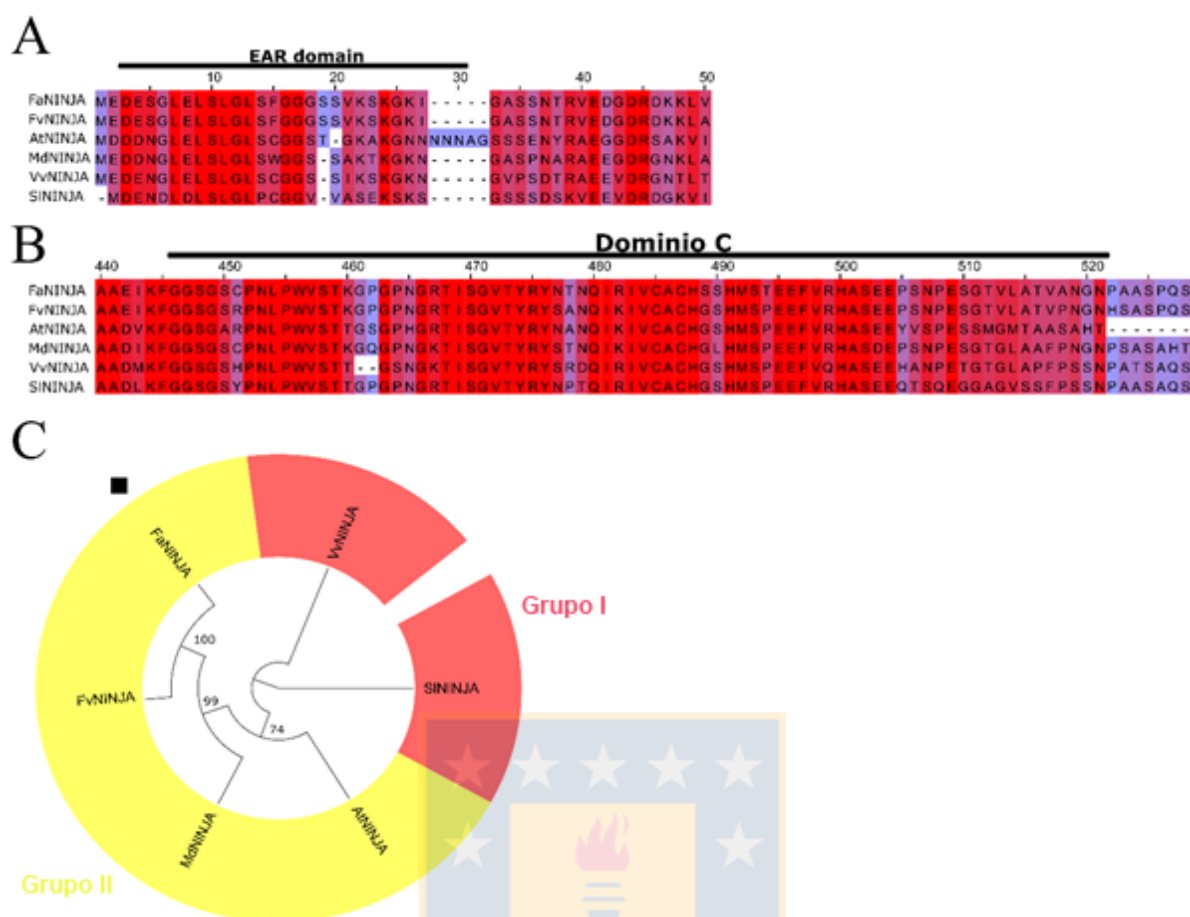


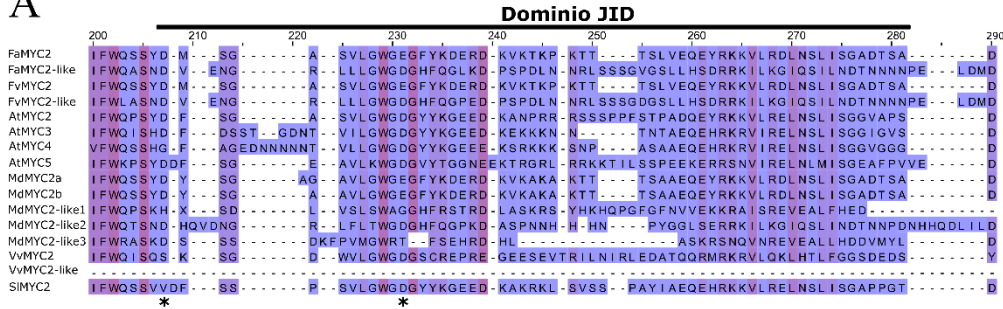
Fig. 5.1. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de la proteína adaptadora NINJA de *Fragaria* × *ananassa* y sus ortólogos. Alineamiento múltiple del dominio EAR (A), el dominio C (B) y análisis filogenético de las proteínas NINJA (C). Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression (EAR); JAZ, JASMONATE-ZIM domain; NINJA, Novel interactor of JAZ. FaNINJA, *Fragaria* × *ananassa* NINJA; FvNINJA, *Fragaria vesca* NINJA; AtNINJA, *Arabidopsis thaliana* NINJA; MdNINJA, *Malus* × *domestica* NINJA; VvNINJA, *Vitis vinifera* NINJA; SININJA, *Solanum lycopersicum* NINJA.

El alineamiento múltiple de los FTs MYCs mostraron conservación del dominio JID en *F. × ananassa*, *F. vesca* y sus ortólogos, excepto para VvMYC2-like el cual carece de esta región conservada (Fig. 5.2A). Por otro lado, el dominio de activación (TAD) indicó una alta conservación (Fig. 5.2B) y el dominio bHLH mostró una conservación cercana al 100% en la mayor parte de los residuos de aminoácidos (Fig. 5.2C). FaMYC2 y FaMYC2-like presentaron los mayores porcentajes de identidad con FvMYC2 (99,56) y MdMYC2a (80,72%), y con FvMYC2-like (97,35%) y MdMYC2-like2 (70,40%), respectivamente (Tabla S5.4). Con el

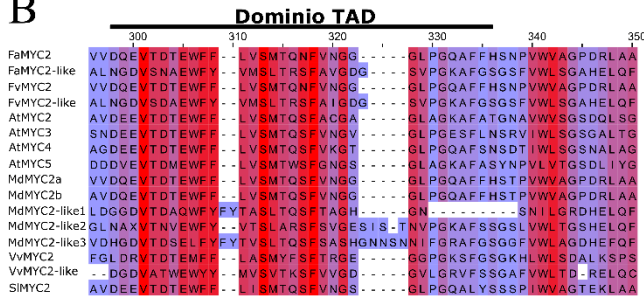
resto de ortólogos las identidades fueron inferiores al 80% (Tabla S5.4). El análisis filogenético generó el grupo I donde fueron agrupados los FT MYC2 de *F. × ananassa* y *F. vesca*, cercanos a MYC2a de *M. × domestica* (Fig. 5.2D), y el grupo II donde se agruparon FaMYC2-like, FvMYC2-like y MdMYC2-like2 (Fig. 5.2D).



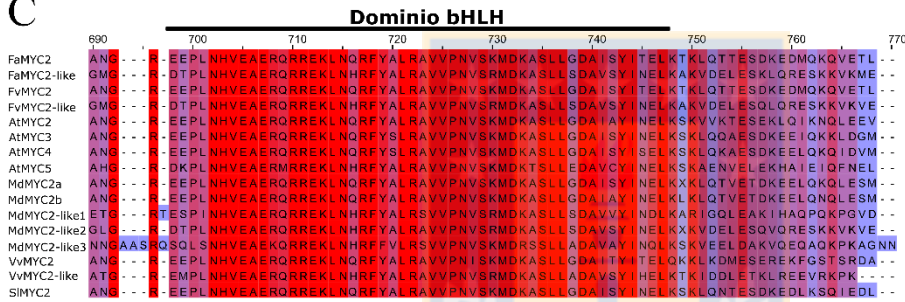
A



B



C



D

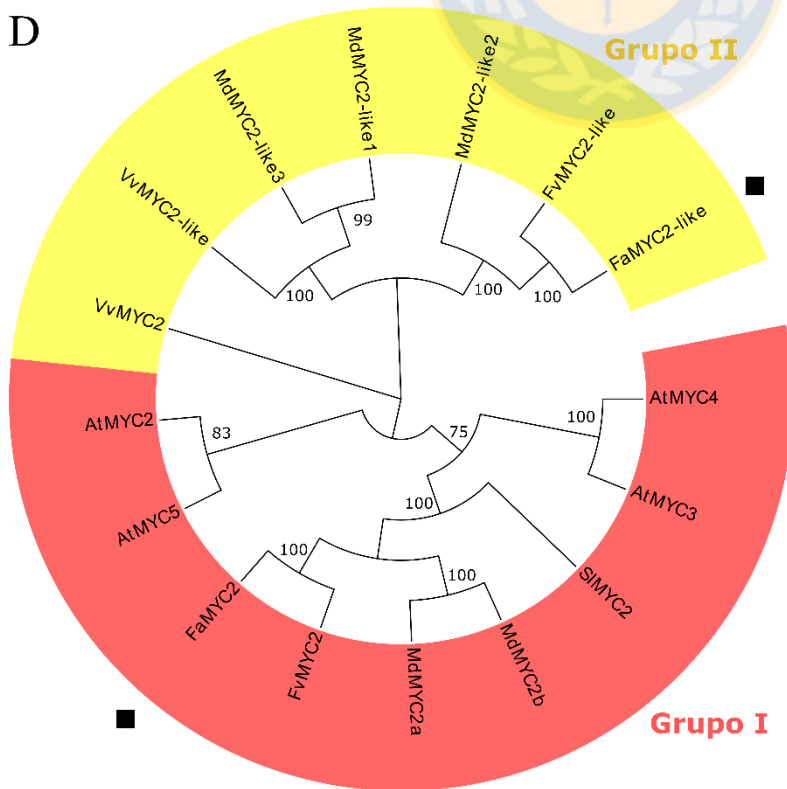


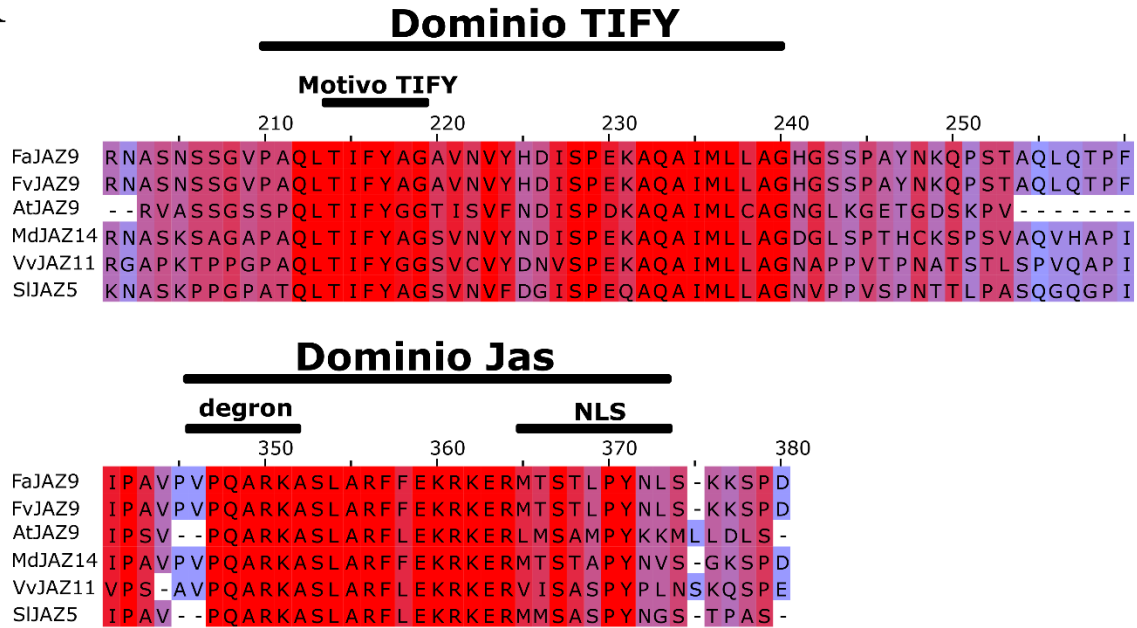
Fig. 5.2. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de la proteína adaptadora MYC2 de *Fragaria* × *ananassa* y sus ortólogos. Alineamiento múltiple del dominio JID (A), TAD (B), bHLH (C) y análisis filogenético de las proteínas MYCs (D). En (A) ‘*’ indica residuos de aminoácidos necesarios para la interacción con las proteínas JAZ (Goossens et al. 2015). En (D) ‘■’ indica las secuencias MYC2 y MYC2-like en *F. × ananassa*. bHLH, basic helix-loop-helix; JID, JAZ-interacting domain; JAZ, JASMONATE-ZIM domain; TAD, transactivation domain. FaMYC2, *Fragaria* × *ananassa* MYC2; FaMYC2-Llike, *F. × ananassa* MYC2-like; FvMYC2, *Fragaria vesca* MYC2; FvMYC2-Llike, *F. vesca* MYC2-like; AtMYC2, *Arabidopsis thaliana* MYC2; AtMYC3, *A. thaliana* MYC3; AtMYC4, *A. thaliana* MYC4; MdMYC2a, *Malus × domestica* MYC2a; MdMYC2b, *M. × domestica* MYC2b; MdMYC2-like1, *M. × domestica* MYC2-like1; MdMYC2-like2, *M. × domestica* MYC2-like2; MdMYC2-like3, *M. × domestica* MYC2-like3; VvMYC2, *Vitis vinifera* MYC2; VvMYC2-like, *Vitis vinifera* MYC2-like; SlMYC2, *Solanum lycopersicum* MYC2.

El dominio JID de los antagonistas JAM1 y JAM2 exhibió una alta conservación respecto a sus ortólogos (Fig. 5.3A). La región equivalente al dominio de activación (TAD) presente en los FTs tipo MYC (Fig.5.2.B), mostró cierto grado de conservación entre las proteínas JAMs de *F. × ananassa*, *F. vesca* y sus ortólogos (Fig. 5.3B), mientras que el dominio bHLH fue el que tenía un grado de conservación mayor de los residuos de aminoácidos (Fig. 5.3C). Para FaJAM1/bHLH013 se observó una mayor identidad con FvJAM1/bHLH013 (99,03%) y MdbHLH013 (79,28%), aunque con MdbHLH013-like mostró una identidad similar del 79,12% (Tabla S5.5). Con su ortólogo AtJAM2/bHLH013 la identidad fue del 57,09%, cercana a la obtenida para AtJAM1/bHLH017 (51,48%) (Tabla S5.5). FaJAM2/bHLH003 exhibió la mayor identidad con FvJAM2/bHLH003 (97,39%), así como con MdbHLH003-like1 y MdbHLH003-like2 que fue del 75,96 y 74,75%, respectivamente (Tabla S5.5). Finalmente, la mayor identidad para las proteínas AtJAMs fue obtenida para AtJAM3/bHLH003 (57,59%) (Tabla S5.5). Respecto al análisis filogenético, FaJAM1/bHLH013 agrupó a los bHLH013 de *F. vesca*, *M. domestica* y *S. lycopersicum*, además de un bHLH003 de *S. lycopersicum* en el grupo I (Fig. 5.3D). Por otra parte, FaJAM2/bHLH003 agrupó junto a otros ortólogos bHLH003 en el grupo II, incluyendo JAM3/bHLH003 de *A. thaliana* (Fig. 5.3D). Finalmente, JAM1/bHLH017 y JAM2/bHLH013 fueron agrupados juntos en el grupo III (Fig. 5.3D).

Fig. 5.3. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de las proteínas JAMs de *Fragaria* × *ananassa* y sus ortólogos. Alineamiento múltiple del dominio JID (A), región equivalente al dominio TAD (B), bHLH (C) y análisis filogenético de las proteínas JAMs (D). En (A) ‘*’ indica residuos de aminoácidos necesarios para la interacción con las proteínas JAZ (Goossens et al. 2015). En (B) el recuadro indica la región equivalente al dominio TAD de los FT MYCs. En (D) ‘■’ indica las secuencias JAM1/bHLH013 y JAM2/bHLH003 en *F. × ananassa*. bHLH, basic helix-loop-helix; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like; JID, JAZ-interacting domain; JAZ, JASMONATE-ZIM domain; TAD, transactivation domain. FaJAM1/bHLH013, *Fragaria × ananassa* JAM1/bHLH013; FaJAM2/bHLH003, *F. × ananassa* JAM2/bHLH003; FvJAM1/bHLH013, *Fragaria vesca* JAM1/bHLH013; FaJAM2/bHLH003, *F. vesca* JAM2/bHLH003; AtJAM1/bHLH017, *A. thaliana* JAM1/bHLH017; AtJAM2/bHLH013, *A. thaliana* JAM3/bHLH003; AtJAM3/bHLH003, *A. thaliana* JAM2/bHLH013; MdbHLH003-like1, *Malus × domestica* bHLH003-like1; MdbHLH003-like2, *M. × domestica* bHLH003-like2; MdbHLH013, *M. × domestica* bHLH013; MdbHLH013-like, *M. × domestica* bHLH013-like; VvbHLH003, *Vitis vinifera* bHLH003; SlbHLH003, *Solanum lycopersicum* bHLH003; SlbHLH003-like, *S. lycopersicum* bHLH003-like; SlbHLH013-like, *S. lycopersicum* bHLH013-like.

Por otro lado, se realizó un alineamiento múltiple de la proteína JAZ9 de *F. × ananassa* con sus ortólogos en otras especies, para estudiar la conservación estructural de la secuencia de aminoácidos (Fig. 5.4). FaJAZ9 mostró un alto grado de identidad con la proteína FvJAZ9, y al igual que FaJAZ10 se observó un alto porcentaje de identidad con las proteínas JAZ13 y JAZ14 de *M. × domestica* (Tabla S5.6), mientras que las proteínas ortólogas en *A. thaliana*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* mostraron una identidad entre 38,04 y 47,40% (Tabla S5.6). Respecto a los dominios de la secuencia de aminoácidos de FaJAZ9, tanto el dominio TIFY como el dominio Jas mostraron un grado de conservación cercano al 100% (Fig. 5.4A). El dominio Jas contiene la secuencia de degron VPAQRK y la señal de localización nuclear (NLS) bien conservada (Fig. 5.4A). El análisis filogenético agrupó a la proteína FaJAZ9 en el grupo II, junto con sus ortólogos FvJAZ9 y MdJAZ13/14 (Fig. 5.4B), mientras que las proteínas ortólogas AtJAZ9, VvJAZ11 y SlJAZ5 se agruparon juntas en el grupo I (Fig. 5.4B).

A



B

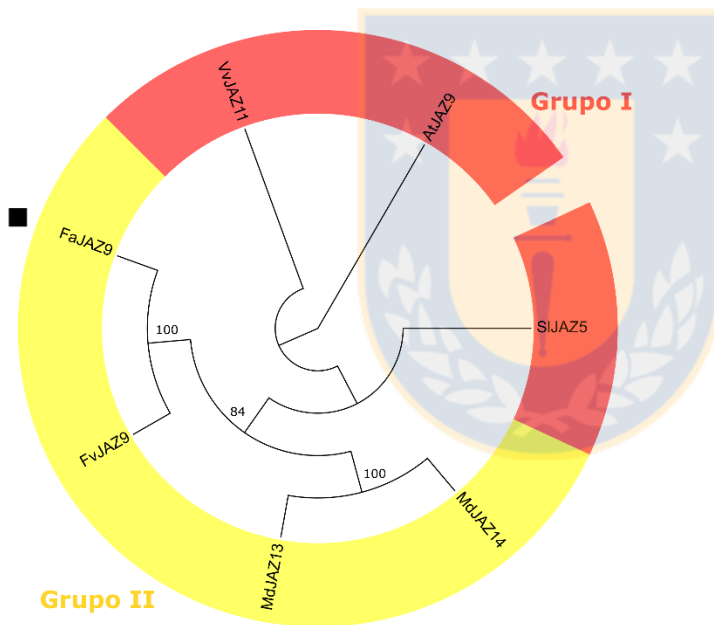


Fig. 5.4. Comparación de JAZ9 de *Fragaria* × *ananassa* con sus ortólogos. Alineamiento múltiple de dominios TIFY y Jas (A), y análisis filogenético de las secuencias de FaJAZ9 con sus ortólogos (B). En (A) color rojo significa 100% de identidad y variación hacia el azul indica una mayor diversidad de los residuos de aminoácidos. En (B) '■' indica la proteína JAZ9 de *F. × ananassa*. JAZ, Jasmonate ZIM-domain; NLS, nuclear signal location. FaJAZ, *F. × ananassa* JAZs; FvJAZ; *F. vesca* JAZ; AtJAZ, *A. thaliana* JAZ; MdJAZs, *M. × domestica* JAZs; VvJAZ, *V. vinifera* JAZ; SIJAZ, *S. lycopersicum* JAZ.

5.4.3. Conservación de las secuencias de aminoácidos de bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 en *Fragaria* × *ananassa*.

Los alineamientos múltiples para los FTs bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 de *F.* × *ananassa*, relacionados con la biosíntesis de PAs y antociainas, fueron realizados para evaluar el grado de conservación de los dominios bHLH y CT implicados en la interacción con los represores JAZ. Por otro lado, los análisis filogenéticos se realizaron para evaluar las relaciones evolutivas entre los FTs de *F.* × *ananassa* y sus ortólogos.

El dominio bHLH de FabHLH3-2 indicó un alto grado de conservación de los residuos de aminoácidos en *F.* × *ananassa*, *F. vesca* y sus ortólogos (Fig. 5.5A). Respecto a FabHLH33-2 se observó menor grado de conservación para el mismo dominio (Fig. 5.5B), y el dominio CT mostró una menor conservación entre *F.* × *ananassa* y el resto de proteínas ortólogas (Fig. 5.5B). Los mayores porcentajes de identidad entre FabHLH3-2 y sus ortólogos fueron observados para FabHLH3¹ (100 %), FvbHLH3 (94,69 %) y MdbHLH3 (80,55 %), y los menores mostraron un 56,65 y 56,51% para los ortólogos AtTT8 y SlbHLH3, respectivamente (Tabla S5.7). FabHLH33¹ y FvbHLH33 tuvieron una identidad del 99,62 y 97,51 % con FabHLH33-2, respectivamente, seguido de MdbHLH33 (76,21 %), y la menor identidad fue observada con el ortólogo AtEGL3 (45,64 %) y SlbHLH3 (44,96 %) (Tabla S5.7). Respecto a la identidad de FaMYB10-2 y sus ortólogos, la mayor fue obtenida para con FaMYB10 (97,42 %) y FvMYB10 (94,44 %), sin embargo, con MdMYB10 la identidad fue del 49,10 % (Tabla S5.7). Los análisis filogenéticos mostraron la relación evolutiva de los tres FTs en *F.* × *ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *M. × domestica*, *A. thaliana*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* (Figs. 5.5D-F). En todos los casos, los FTs FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 fueron agrupados junto a sus ortólogos en *F. vesca* y *M. × domestica* en el grupo I, mientras que el resto de ortólogos de *A. thaliana*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* fueron agrupados juntos en el grupo II (Figs. 5.5D-F).

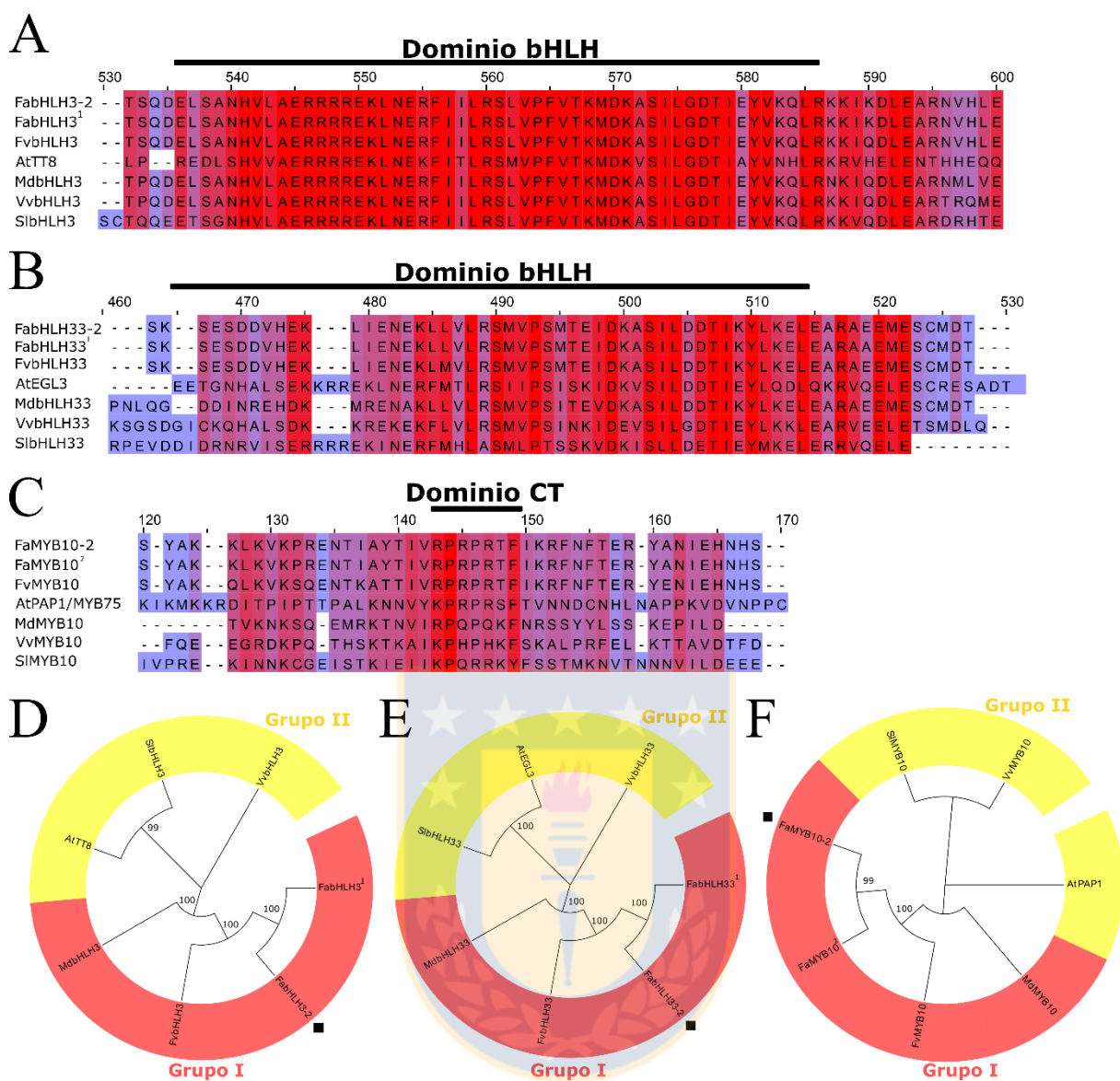


Fig. 5.5. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de los factores de transcripción bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 de *Fragaria × ananassa* y sus ortólogos. Alineamiento múltiple de los dominios bHLH (A, B), CT (C) y análisis filogenéticos (D) de las proteínas bHLH3, bHLH33 y MYB10, respectivamente. En (D), (E), y (F) '■' indica las secuencias bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 en *F. × ananassa* obtenidas en esta investigación. bHLH, basic helix-loop-helix; CT, C-terminal; EGL3, Enhancer of Glabra 3; PAP1, TRANSPARENT TESTA 8; PAP1, Production of Anthocyanin Pigment 1. FabHLH3, *Fragaria × ananassa* bHLH3, . FabHLH3¹, *F. × ananassa* bHLH3 (Schaart et al. 2013); FvbHLH3, *Fragaria vesca* bHLH3; AtTT8, *Arabidopsis thaliana* TT8; MdbHLH3, *Malus × domestica* bHLH3; VvbHLH3, *Vitis vinifera* bHLH3; SibHLH3, *Solanum lycopersicum* bHLH3; FabHLH33, *Fragaria × ananassa* bHLH33; FabHLH33¹, *F. × ananassa* bHLH33 (Schaart et al. 2013); FvbHLH33, *F. vesca* bHLH33; AtEGL3, *A. thaliana* EGL3;

MdbHLH33, *M. × domestica* bHLH33; VvbHLH33, *V. vinifera* bHLH33; SlbHLH33, *S. lycopersicum* bHLH33; FaMYB10, *F. × ananassa* FaMYB10, FaMYB10², *F. × ananassa* FaMYB10 (Lin-Wang et al. 2010); FvMYB10, *F. vesca* MYB10; AtPAP1/MYB75, *A. thaliana* PAP1/MYB75; MdMYB10, *M. × domestica* MYB10; VvMYB10, *V. vinifera* MYB10; SlMYB10, *S. lycopersicum* MYB10.

5.4.4. Interacciones de proteínas JAZ con componentes de la señalización de JAs.

Con el fin de estudiar la conservación funcional de las proteínas JAZ como reguladores de la vía de señalización de los JAs en *F. × ananassa*, mediante interacciones proteína-proteína, se evaluó la interacción directa de las proteínas JAZ1, JAZ8.1, JAZ9 y JAZ10 con la proteína adaptadora NINJA, el FT MYC2 y FT antagonista JAM1, mediante el sistema de Y2H (Fig. 5.6).

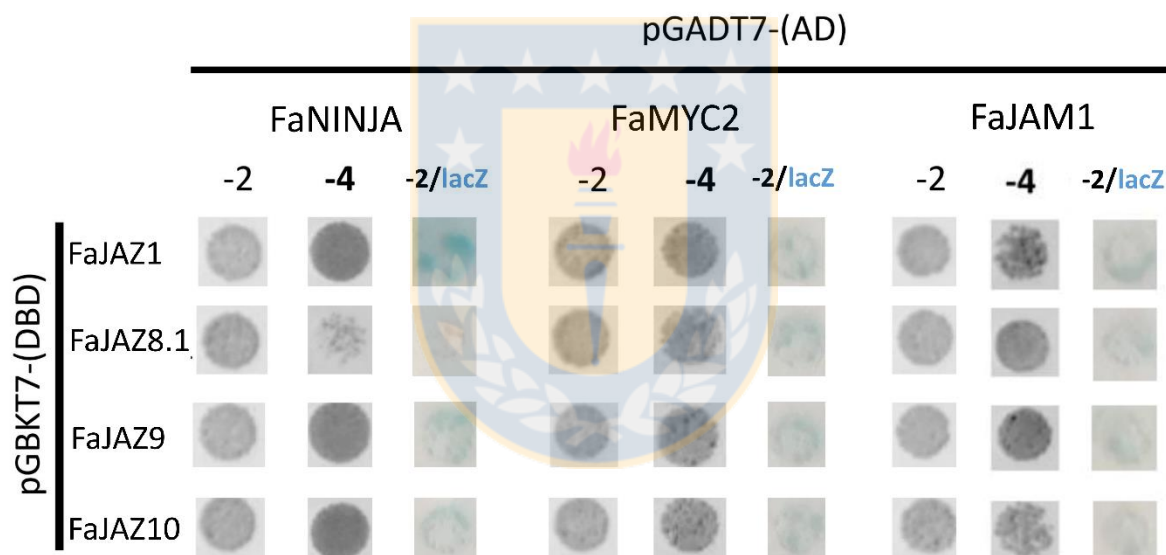


Fig. 5.6. Interacciones de las proteínas JAZs con componentes de la vía de señalización de los JAs en *F. × ananassa*. Interacciones entre las construcciones pGADT7-(AD)-FaNINJA/MYC2/JAM1 y pGBKT7-(DBD)-FaJAZs. -2, SD+DO –Leu-Trp; -4, SD+DO –Leu-Trp-Ade-His; AD, dominio de activación; DBD, dominio de union al ADN; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED DOMAIN; JAZ, JAZMONATE-ZIM DOMAIN; *lacZ*, gen β -galactosidasa.

En primer lugar, para descartar la activación de los genes reporteros por parte de las proteínas JAZ, se evaluaron las interacciones entre *FaJAZ* clonadas en el vector destino

pGBKT7-(DBD) y en el vector destino pGADT7-(AD) vacío (Fig. S5.6A). El mismo procedimiento fue seguido para evaluar la activación de la expresión de los genes reporteros por parte de NINJA, MYC2 y JAM1, clonados en el vector pGADT7-(AD) y el vector pGBKT7-(DBD) vacío (Fig. S5.6B). En ninguna de las dos situaciones anteriores se observó activación de los genes reporteros, indicado por ausencia de crecimiento y de coloración azul de las levaduras (Fig. 5.6, S5.6A-B).

La proteína FaNINJA mostró una clara interacción con las proteínas represoras FaJAZ1, FaJAZ9 y FaJAZ10 (Fig. 5.6), observadas mediante crecimiento en medio SD-Leu-Trp-Ade-His (-4). Por otra parte, se observó escasa interacción entre FaNINJA-FaJAZ8.1 mediante crecimiento de la colonia, sin embargo, la actividad galactosidasa indicó ausencia de interacción entre ambas proteínas (Fig. 5.6). Los FTs FaMYC2 y FaJAM1 indicaron una clara interacción con las proteínas represoras FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 (Fig. 5.6), a través del crecimiento de las colonias en condiciones restrictivas de medio de cultivo SD-Leu-Trp-Ade-His (-4), lo que fue confirmado en el ensayo β -galactosidasa por coloración azul de las mismas. Globalmente, estos resultados indicaron que el sistema represor de los FTs de la vía de señalización de los JAs está conservado, y que existe redundancia funcional para la represión de las proteínas FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 en *F. × ananassa*.

5.4.5. Interacción entre las proteínas JAZ y factores de transcripción del complejo MBW.

Para explorar la represión de las proteínas JAZ sobre los FTs bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 del complejo MBW que regulan la biosíntesis de PAs y antocianinas, se estudiaron las interacciones proteína-proteína mediante Y2H (Fig. 5.7).

De igual forma a lo expuesto anteriormente, se evaluó la activación de los genes reporteros por los FTs bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2 clonados en el vector pGADT7-(AD) y el vector pGBKT7-(DBD) vacío (Fig. S5.6C). Los resultados indicaron que no ocurrió expresión de los genes reporteros mediada por los FTs evaluados, ya que no se observó crecimiento de las colonias o coloración azul de las mismas (Fig. 5.6C).

Las proteínas FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 mostraron interacción con el FT bHLH3-2, indicado por crecimiento de las colonias en medio SD-Leu-Trp-Ade-His (-4) y coloración de las mismas por la activación del gen reportero lacZ, sin embargo, JAZ1 no interaccionó con el FT FabHLH3-2 (Fig. 5.7). En el caso de FabHLH33-2 este solo mostró interacción con FaJAZ1 (Fig. 5.7). Por otro lado, se observó crecimiento y coloración azul de las colonias, en las

interacciones entre FaMYB10-2 y los represores FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ9 y no así con FaJAZ10 (Fig. 5.7). Conjuntamente, los resultados informaron que los represores FaJAZs regulan los FTs implicados en la biosíntesis de PAs y antocianinas, mediante interacciones proteína-proteína, y en algunos casos como bHLH3-2 y MYB10-2 sus funciones son redundantes en *F. × ananassa*.

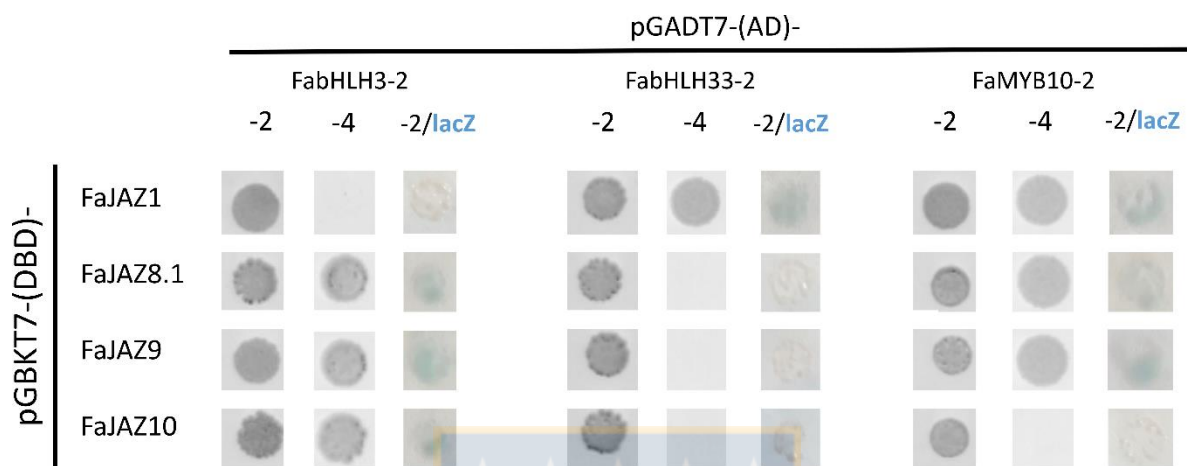


Fig. 5.7. Interacciones de las proteínas JAZs con factores de transcripción del complejo MBW en *F. × ananassa*. Interacciones entre las construcciones pGADT7-(AD)-bHLH3-2/bHLH33-2/MYB10-2 y pGBKT7-(DBD)-FaJAZs. -2, SD+DO -Leu-Trp; -4, SD+DO -Leu-Trp-Ade-His; AD, dominio de activación; DBD, dominio de unión al ADN; JAZ, JAZMONATE-ZIM DOMAIN; *lacZ*, gen reportero β -galactosidasa.

5.5. Discusión.

5.5.1. Conservación de los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos en *F. × ananassa*.

Las proteínas represoras JAZ son reguladores centrales de la vía de señalización de los jasmonatos en *Arabidopsis*, mediante interacciones con los FTs tipo MYC y los FTs antagonistas JAMs (Chini et al., 2016; Fernández-Calvo et al., 2011; Fonseca et al., 2014; Goossens et al., 2017; Wasternack, 2014), además de interactuar con la proteína adaptadora NINJA para la formación del complejo represor de los FTs tipo MYC (Pauwels et al., 2010). Las proteínas represoras JAZ1, JAZ8, JAZ9 y JAZ10 han sido ampliamente estudiadas como represores de la vía de señalización de los JAs en *Arabidopsis* (Chini et al., 2007; Fernández-Calvo et al., 2011; Fonseca et al., 2014; Pauwels et al., 2010; Thines et al., 2007). Los ortólogos

de estas proteínas mantienen la conservación de los dominios estructurales TIFY y Jas en *F. vesca* (Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, et al., 2018b) y *F. × ananassa* (Figs. 4.2, 5.4).

En *A. thaliana*, la proteína adaptadora NINJA contiene varios dominios estructurales, principalmente el dominio EAR para la interacción con las proteínas co-represoras TOPLESS (Pauwels et al., 2010), y los dominios A, B y C, siendo este último el encargado de la interacción con las proteínas represoras JAZ (Pauwels et al., 2010). En *F. × ananassa*, se observó una alta conservación estructural de los residuos de aminoácidos presentes en dominios EAR y C (Fig. 5.1A-B), sugiriendo su participación en la formación del complejo represor e inhibición de las respuestas a JAs.

Por otra parte, los FTs tipo MYC (MYC2, MYC3, MYC4 y MYC5) son activadores transcripcionales de las respuestas a JAs (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012, 2015), y están implicados en la regulación de la biosíntesis y acumulación de antocianinas en Arabidopsis (Dombrecht et al., 2007; Lorenzo et al., 2004). En el caso de MYC2, su rol en la biosíntesis de antocianinas también ha sido reportado para especies de la familia Rosaceae como *M. × domestica* (An et al., 2016). En *F. vesca*, fueron previamente caracterizados dos FTs tipo MYC, FvMYC2 y FvMYC2-like, con una alta conservación de los dominios JID y bHLH (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b), los cuales están implicados en la interacción con las proteínas JAZ, y la unión a la regiones promotoras G-box de los genes de respuestas a JAs en Arabidopsis (Fernández-Calvo et al., 2011; Figueroa & Browse, 2012). También han sido reportada la expresión durante el desarrollo, siendo mayoritaria en floración y estadios verdes de fruto, y disminuyendo con el transcurso del proceso de maduración de los frutos (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b). Respecto a la estructura de dominios JID y bHLH, se observó alta conservación en FaMYC2 y FaMYC2-like de *F. × ananassa* para el dominio bHLH (Fig. 5.2C), similar a lo observado en *F. vesca* (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b), sin embargo, el dominio JID mostró una baja conservación debido a la ausencia de este dominio en el ortólogo VvMYC2-like (Fig. 5.2A). Además, los FTs tipo MYC contienen el dominio de transactivación (TAD), encargado de la activación de la transcripción en Arabidopsis (Fernández-Calvo et al., 2011; Kazan & Manners, 2013), y el cual también se encuentra conservado en FaMYC2 y FaMYC2-like (Fig. 5.2B). Por otro lado, se observó una alta identidad entre estos FTs y sus ortólogos en *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum* (Tabla S5.2). Finalmente, el análisis filogenético mostró cercanía evolutiva con las proteínas ortólogas en *F. vesca* y *M. × domestica* (Fig. 5.2D), similar a lo anteriormente

reportado en *F. vesca* (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b), todas ellas pertenecientes a la familia Rosaceae (Xiang et al., 2017).

Las proteínas JAM1/bHLH017, JAM2/bHLH013 y JAM3/bHLH003 son antagonistas de los MYC en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), y poseen los dominios conservados JID y bHLH, para la interacción con el dominio Jas de los represores JAZ (Fonseca et al., 2014), y la unión competitiva a las regiones promotoras de los genes de respuesta a JAs (Nakata et al., 2013), respectivamente. Sin embargo, carecen del dominio TAD para la activación de la transcripción (Fonseca et al., 2014, 2014; Goossens et al., 2017). En *F. vesca* han sido previamente caracterizados FvJAM1/bHLH013 y FvJAM2/bHLH003 (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b), y en *F. × ananassa*, sus niveles de expresión muestran un perfil similar a los FaMYCs, siendo mayoritarios en los estadios de flor y del desarrollo temprano de los frutos (Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa., 2018b). En *F. × ananassa*, los dominios JID y bHLH se mostraron altamente conservados (Fig. 5.2A, B), y la región equivalente al dominio TAD de los FTs MYC muestra una buena conservación entre los ortólogos (Fig. 5.2C). Finalmente, la identidad entre las proteínas FaJAM1 y FaJAM2 fue mayor con sus ortólogos en *F. vesca* y *M. × domestica* (Tabla S5.5), y fueron agrupadas en el mismo grupo en el árbol filogenético (Fig. 5.2D), de acuerdo a lo esperado para especies pertenecientes a la familia de las rosáceas (Xiang et al., 2017).

5.5.2. Conservación de los factores de transcripción del complejo MBW en *F. × ananassa*.

En *A. thaliana*, las proteínas JAZs son reguladores de los FTs TT8, EGL3 y PAP1/MYB75 del complejo MBW que controla la biosíntesis de PAs y antocianinas (Qi et al., 2011). AtTT8 y AtEGL3 contienen en su estructura el dominio conservado bHLH, mientras que PAP1/MYB75 contiene el dominio CT, los cuales son necesarios para su interacción con los represores JAZ (Qi et al., 2011). En *F. × ananassa* los ortólogos de AtTT8, AtEGL3 y AtPAP1/MYB75 fueron anteriormente reportados como reguladores de la biosíntesis de PAs y antocianinas, nombrados como FabHLH3, FabHLH33 y FaMYB10, respectivamente (Lin-Wang et al., 2010; Schaart et al., 2013). En esta investigación, fueron clonadas secuencias que codifican isoformas diferentes a las anteriormente reportadas, y nombradas como FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2. En estas, los dominios bHLH y CT se encontraron altamente conservados en *F. × ananassa* (Fig. 5.5A-C). Por otro lado, los análisis filogenéticos mostraron relaciones evolutivas cercanas entre FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 con sus

ortólogos en *F. vesca* y *M. × domestica* (Fig. 5.5D-F), todas ellas pertenecientes a la familia Rosaceae (Xiang et al., 2017).

5.5.3. Interacciones entre las proteínas represoras JAZs y los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos en *F. × ananassa*.

Los represores JAZ son reguladores centrales de la vía de señalización de los JAs (Chini et al., 2016; Goossens et al., 2017), y han sido identificadas un total de 13 proteínas JAZ en *Arabidopsis* (Chini et al., 2016; Thireault et al., 2015). Por un lado, las JAZs contienen el dominio TIFY, el cual permite la interacción con el dominio C de la proteína adaptadora NINJA para la formación del complejo represores de las respuestas a JAs en *Arabidopsis* (Pauwels et al., 2010; Pauwels & Goossens, 2011), sin embargo, en el caso de JAZ7 y JAZ8 no se ha detectado interacción (Pauwels et al., 2010). En esta investigación fueron evaluadas las interacciones de FaNINJA con FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 mediante Y2H, y los resultados fueron similares a los obtenidos por Pauwels et al., (2010), de forma que todas las proteínas JAZs, excepto JAZ8.1, mostraron interacción con la proteína adaptadora NINJA (Fig. 5.6). Sin embargo, Pauwels et al., (2010) reportaron la interacción NINJA-JAZ8 mediante la sobreexpresión de NINJA en experimento pull-down. Los resultados observados para la interacción NINJA-JAZ8 en *F. × ananassa* indicaron una leve interacción entre ambas proteínas (Fig. 5.6). Por otro lado, los represores JAZ interactúan con los FTs MYCs para inhibir las respuestas a JAs (Fernández-Calvo et al., 2011) y esto se ha relacionado con la biosíntesis de antocianinas (Chini et al., 2016; Goossens et al., 2017). El FT FaMYC2 mostró interacción proteína-proteína con FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 (Fig. 5.6), de acuerdo a lo anteriormente reportado para sus ortólogos en *A. thaliana* (Fernández-Calvo et al., 2011; Qi et al., 2011). Estas interacciones estarían mediadas por el dominio Jas de las proteínas FaJAZs (Figs. 4.2A, 5.4A) y el dominio JID conservado presente en el FTs MYC2 (Fig. 5.2A), tal como se reportó anteriormente (Fernández-Calvo et al., 2011). Finalmente, los FTs JAM son antagonistas de los MYCs, ya que se unen a regiones promotoras de los genes de respuesta a JAs (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), y también son dianas moleculares de los represores JAZ (Fonseca et al. 2014), e inhibidores de la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2014; Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013). Los represores JAZ (JAZ1-JAZ12) interactúan con las proteínas JAM en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2014), y los resultados de la presente investigación, indicaron una

conservación funcional de las interacciones entre JAZ1, JAZ8.1, JAZ9 y JAZ10 como reguladores de la proteína JAM1 en *F. × ananassa*.

5.5.4. Interacciones entre las proteínas represoras JAZs y los factores de transcripción del complejo MBW en *F. × ananassa*.

Los componentes del complejo MBW en Arabidopsis, constituido por los FTs AtTT8, AtEGL3 y AtPAP1/MYB75, entre otros, son dianas moleculares de algunas de las proteínas JAZ (Qi et al., 2011). Los ortólogos han sido anteriormente caracterizados y nombrados como bHLH3, bHLH33 y MYB10 en frutilla, respectivamente (Lin-Wang et al., 2010; Schaart et al., 2013), los cuales también fueron clonados en esta investigación y se obtuvieron las isoformas FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 (Fig. 5.5). Las interacciones de estos FTs con las proteínas JAZ1, JAZ8.1, JAZ9 y JAZ10 fueron evaluadas para estudiar la conservación funcional de la regulación de la biosíntesis de PAs y antocianinas mediada por la vía de señalización de los JAs (Fig. 5.7). En *F. × ananassa*, bHLH3-2 interactuó con los represores JAZ8.1, JAZ9 y JAZ10 (Fig. 5.7) de acuerdo a lo anteriormente reportado en Arabidopsis (Qi et al., 2011), sin embargo, para JAZ1 no se observó interacción (Fig. 5.7), la cual si ocurre en el ortólogo AtTT8 con AtJAZ1 (Qi et al., 2011). Por otro lado, bHLH3 es una diana de JAZ2 en *M. × domestica*, sugiriendo conservación del mecanismo represor en las rosáceas (An et al., 2015). En el caso de FabHLH33-2, únicamente FaJAZ1, de todas las FaJAZs evaluadas, parece ser el regulador mediante interacción proteína-proteína (Fig. 5.7), mientras que en Arabidopsis todos los ortólogos interactúan con AtEGL3 (Qi et al., 2011). Es importante destacar que, la secuencia de FabHLH33-2 clonada en esta investigación podría ser una isoforma del FT equivalente reportado por (Schaart et al., 2013), y la presencia de regiones adicionales en la secuencia de aminoácidos podría interferir con la interacción de las proteínas JAZ. Para FaMYB10-2 se observaron interacciones con FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ9, no así con FaJAZ10 (Fig. 5.7), aunque su ortólogo AtJAZ10 muestra interacción con PAP1/MYB75 en Arabidopsis (Qi et al., 2011). Finalmente, el dominio conservado Jas, sin incluir la secuencia de degradación, de FaJAZs (Fig. 4.2, 5.4) sería el mediador de la interacción con el dominio bHLH de FabHLH3-2 y FabHLH33-2, y el dominio CT de FaMYB10-2 (Fig. 5.5), reportados para los ortólogos en *A. thaliana* (Qi et al., 2011).

5.6. Conclusiones.

Globalmente, se observó la conservación estructural de dominios y motivos de la proteína represora FaJAZ9, así como de los componentes de la vía de señalización de JAs FaNINJA, FaMYC2 y FaJAM1. Los FTs FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 también mostraron conservación de su estructura de aminoácidos, concretamente los dominios implicados en la interacción con las proteínas JAZs, anteriormente reportados para *Arabidopsis* (Qi et al., 2011). Por otro lado, las interacciones observadas entre las proteínas FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9, FaJAZ10 con FaNINJA, FaMYC2 y FaJAM1 mostraron la conservación funcional de la vía de señalización de los JAs. Sin embargo, se observaron diferencias en las interacciones mostradas por las dianas moleculares FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 de los represores FaJAZs evaluados, siendo estos posibles reguladores de la acumulación de PAs y antocianinas en *F. × ananassa*. Esto sugiere que existe una especialización funcional de las proteínas FaJAZs como reguladores de los FTs del complejo MBW de *F. × ananassa*, posiblemente debidas a su mayor distancia evolutiva con *A. thaliana*. Finalmente, serían necesarias investigaciones adicionales para comprobar la interacción con otros miembros de la familia de los represores JAZ de *F. × ananassa*, así como el uso de otros métodos de evaluación de interacciones proteína-proteína para confirmar las interacciones observadas en esta investigación.

5.7. Agradecimientos.

Agradecimientos a la Dra. Marcela Torrejón y a los miembros del Laboratorio de Señalización y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad de Concepción, Concepción, Chile), así como al Dr. Roberto Solano y los miembros del Laboratorio de Señalización Hormonal del Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España), por su colaboración y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

5.8. Referencias.

An, J.-P., Li, H.-H., Song, L.-Q., Su, L., Liu, X., You, C.-X., ... Hao, Y.-J. (2016). The molecular cloning and functional characterization of MdMYC2, a bHLH transcription factor in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.032>.

- An, X.-H., Tian, Y., Chen, K.-Q., Liu, X.-J., Liu, D.-D., Xie, X.-B., ... Hao, Y.-J. (2015). MdMYB9 and MdMYB11 are involved in the regulation of the JA-induced biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apples. *Plant & Cell Physiology*, 56(4), 650-662. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu205>.
- Bai, Y., Meng, Y., Huang, D., Qi, Y., & Chen, M. (2011). Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family. *Genomics*, 98(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.05.002>.
- Chai, Y.-M., Jia, H.-F., Li, C.-L., Dong, Q.-H., & Shen, Y.-Y. (2011). FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 5079-5089. <https://doi.org/10.1093/jxb/err207>.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>.
- Chini, Andrea, Ben-Romdhane, W., Hassairi, A., & Aboul-Soud, M. A. M. (2017). Identification of *TIFY/JAZ* family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses. *PLOS ONE*, 12(6), e0177381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177381>.
- Chini, Andrea, Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., & Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 59(1), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03852.x>.
- Chini, Andrea, Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>.
- Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 70, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>.
- Cui, M., Du, J., & Yao, X. (2018). The Binding Mechanism Between Inositol Phosphate (InsP) and the Jasmonate Receptor Complex: A Computational Study. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00963>.

- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(7), 2225-2245. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048017>.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J.,... Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, *23*(2), 701-715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>.
- Figueroa, P., & Browse, J. (2012). The Arabidopsis JAZ2 promoter contains a G-Box and thymidine-rich module that are necessary and sufficient for jasmonate-dependent activation by MYC transcription factors and repression by JAZ proteins. *Plant & Cell Physiology*, *53*(2), 330-343. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr178>.
- Figueroa, P., & Browse, J. (2015). Male sterility in Arabidopsis induced by overexpression of a MYC5-SRDX chimeric repressor. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *81*(6), 849-860. <https://doi.org/10.1111/tpj.12776>.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R.,... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>.
- Fonseca, S., Fernández-Calvo, P., Fernández, G. M., Díez-Díaz, M., Gimenez-Ibanez, S., López-Vidriero, I., ... Solano, R. (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 Are New Targets of JAZ Repressors Negatively Regulating JA Responses. *PLOS ONE*, *9*(1), e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>.
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N. E., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate signalling pathway in strawberry: Genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening. *PLOS ONE*, *13*(5), e0197118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197118>.
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*(1), 101-113. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9710-x>.
- Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., & Napier, R. (2017). Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, *68*(6), 1333-1347. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw440>.

- Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G., & Goossens, A. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor *JAZ1/TIFY10A* is stimulated by auxin. *EMBO Reports*, *10*(8), 923-928. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.103>.
- He, Z., Zhang, H., Gao, S., Lercher, M. J., Chen, W.-H., & Hu, S. (2016). Evolview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, *44*(Web Server issue), W236-W241. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw370>.
- Huang, Z., Jin, S.-H., Guo, H.-D., Zhong, X.-J., He, J., Li, X., ... Chen, Q.-B. (2016). Genome-wide identification and characterization of *TIFY* family genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses. *PeerJ*, *4*, e2620. <https://doi.org/10.7717/peerj.2620>.
- Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., ... Fang, J. (2016). Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(10), 2045-2065. <https://doi.org/10.1111/pbi.12563>.
- Jia, H., Wang, Y., Sun, M., Li, B., Han, Y., Zhao, Y., ... Jia, W. (2013). Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *The New Phytologist*, *198*(2), 453-465. <https://doi.org/10.1111/nph.12176>.
- Jia, H.-F., Chai, Y.-M., Li, C.-L., Lu, D., Luo, J.-J., Qin, L., & Shen, Y.-Y. (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, *157*(1), 188-199. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>.
- Jiang, Y., & Joyce, D. C. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation*, *39*(2), 171-174. <https://doi.org/10.1023/A:1022539901044>.
- Jung, S., Bassett, C., Bielenberg, D. G., Cheng, C.-H., Dardick, C., Main, D., ... Schaffer, R. J. (2015). A standard nomenclature for gene designation in the Rosaceae. *Tree Genetics & Genomes*, *11*(5), 108. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0931-5>
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular Plant*, *6*(3), 686-703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>.
- Li, X., Yin, X., Wang, H., Li, J., Guo, C., Gao, H., ... Wang, X. (2015). Genome-wide identification and analysis of the apple (*Malus × domestica* Borkh.) *TIFY* gene family. *Tree Genetics & Genomes*, *11*(1), 808. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0808-z>.

- Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X., & Tang, K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from taxus and ginkgo. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *34*(3), 209-214. <https://doi.org/10.1081/PB-200026790>.
- Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T. K., ... Allan, A. C. (2010). An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*, *10*, 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-50>.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *16*(7), 1938-1950. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>.
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A. J. K., Moreno, J. E., Suzuki, K., ... Ohme-Takagi, M. (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *The Plant Cell*, *25*(5), 1641-1656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>.
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, *23*(9), 3089-3100. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089300>.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y.,... 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y.,... Shirasu, K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *163*(1), 291-304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>.
- Schaart, J. G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., van Houwelingen, A. M. M. L., de Vos, R. C. H., Jonker, H. H.,... Bovy, A. G. (2013). Identification and characterization of MYB-

- bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *The New Phytologist*, 197(2), 454-467. <https://doi.org/10.1111/nph.12017>.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R.,... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1079, 105-116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G.,... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>.
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 82(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/tpj.12841>.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends in Plant Science*, 12(6), 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.004>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>.
- Wasternack, Claus. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development — Applied aspects. *Biotechnology Advances*, 32(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.009>.
- Wasternack, Claus, & Song, S. (2017). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303-1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>.

- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* (Oxford, England), 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Xiang, Y., Huang, C.-H., Hu, Y., Wen, J., Li, S., Yi, T., ... Ma, H. (2017). Evolution of Rosaceae Fruit Types Based on Nuclear Phylogeny in the Context of Geological Times and Genome Duplication. *Molecular Biology and Evolution*, 34(2), 262-281. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw242>.
- Yuan, Z., & Zhang, D. (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.024>.
- Zhang, Y., Gao, M., Singer, S. D., Fei, Z., Wang, H., & Wang, X. (2012). Genome-wide identification and analysis of the *TIFY* gene family in grape. *PloS One*, 7(9), e44465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044465>.



5.9. Material Suplementario.

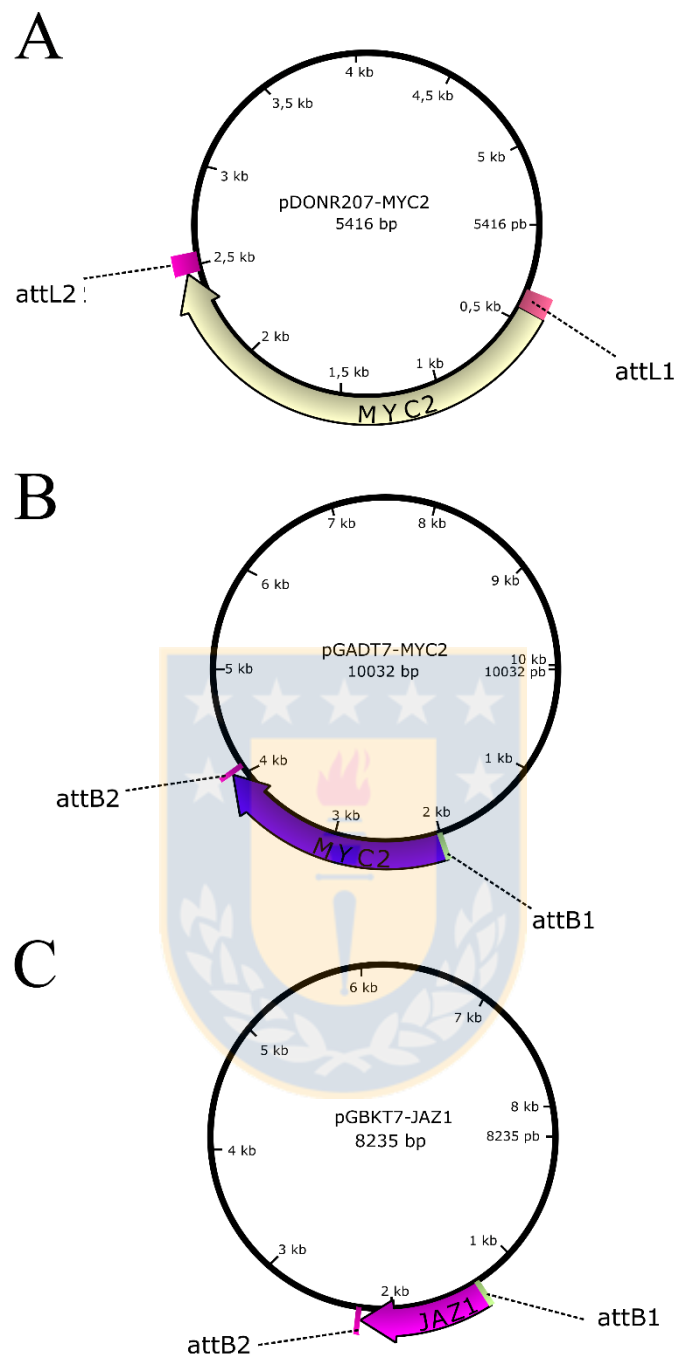


Fig. S5.1. Mapas de las construcciones en el vector dador pDON207-GW y los vectores destino pGADT7-GW y pGBKT7-GW. Construcción pDON207-MYC2 (A), pGADT7-MYC2 (B) y pGBKT7-JAZ1 (C). Las construcciones de *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1*, *FaJAZ9*, *FaJAZ10*, *FaNINJA*, *FaJAM1*, *FabHLH3-2*, *FabHLH33-2* y *FaMYB10-2* en el vector dado pDONR207 fueron creados de igual forma a *FaMYC2*. Las construcciones de *FaNINJA*, *FaJAM1*, *FabHLH3-2*, *FabHLH33-2* y *FaMYB10-2* en el vector destino pGADT7 fueron creadas de igual

forma a FaMYC2. Las construcciones de *FaJAZ8.1*, *FaJAZ9*, *FaJAZ10* en el vector destino pGBKT7 fueron creadas de igual forma a *FaJAZ1*. attL1/L2: sitios necesarios para la recombinación BP y LR, respectivamente; attB1/B2: sitios generados tras la recombinación LR. Elaboración propia a partir de la información disponible en Gateway Technology (Invitrogen, USA).



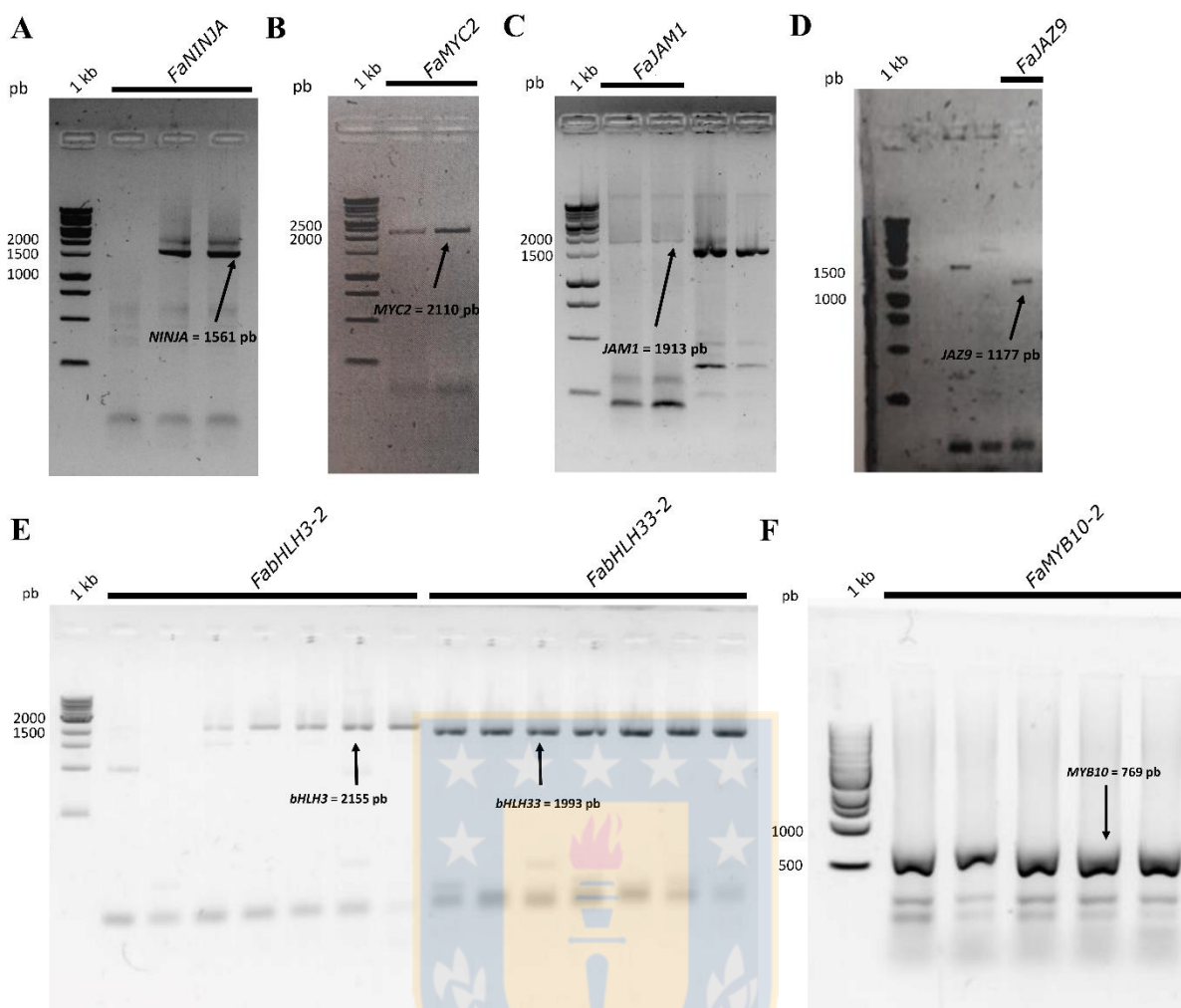


Fig. S5.2. Análisis de tamaño de la region codificante de *FaNINJA* (A), *FaMYC2* (B) *FaJAM1* (C), *FaJAZ9* (D), *FabHLH3-2*, *FaHLH33-2* (E) y *FaMYB10-2* (F) con extremos *attB1* y *attB2* mediante gel de agarosa. Amplificación de secuencias codificantes con extremos *attB1* y *attB2* a partir de ADN complementario, mediante PCR semicuantitativa. Gel de agarosa 1%, condiciones de corrida: 70 V, 45 min. 1 KB, marcador de peso molecular; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE; NINJA, NOVEL INTERACTOR OF JAZ; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

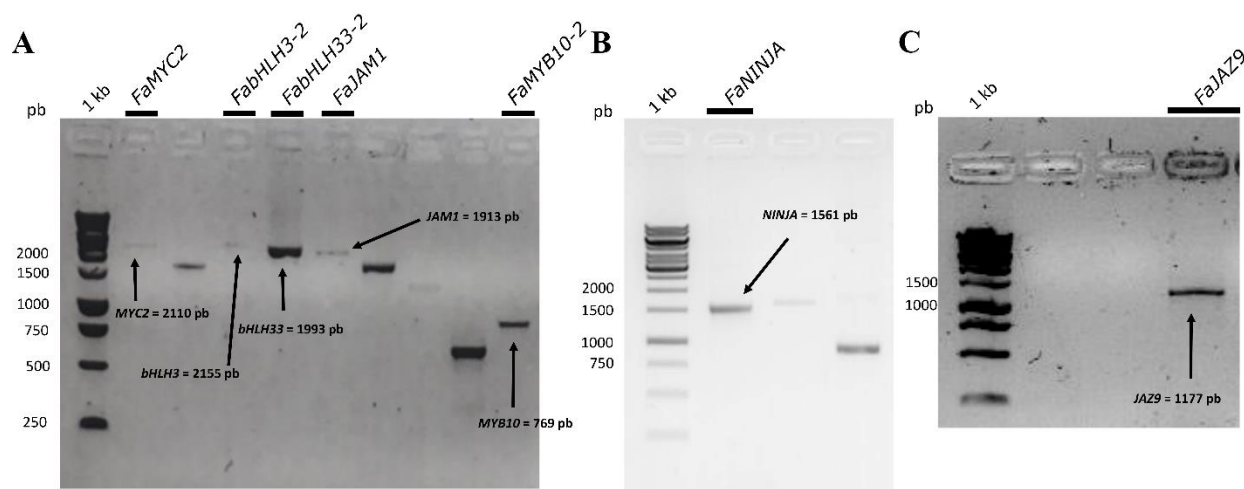


Fig. S5.3. Análisis del tamaño de la región codificante de *FaMYC2*, *FabHLH3-2*, *FabHLH33-2*, *FaJAM1*, *FaMYB10-2* (A), *FaNINJA* (B) y *FaJAZ9* (C) con secuencias attB1 y attB2 purificadas mediante extracción a partir de gel de agarosa. Gel de agarosa 1% (p/v), condiciones de corrida: 70 V, 45 min. 1 KB, marcador de peso molecular; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE; NINJA, NOVEL INTERACTOR OF JAZ; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases.

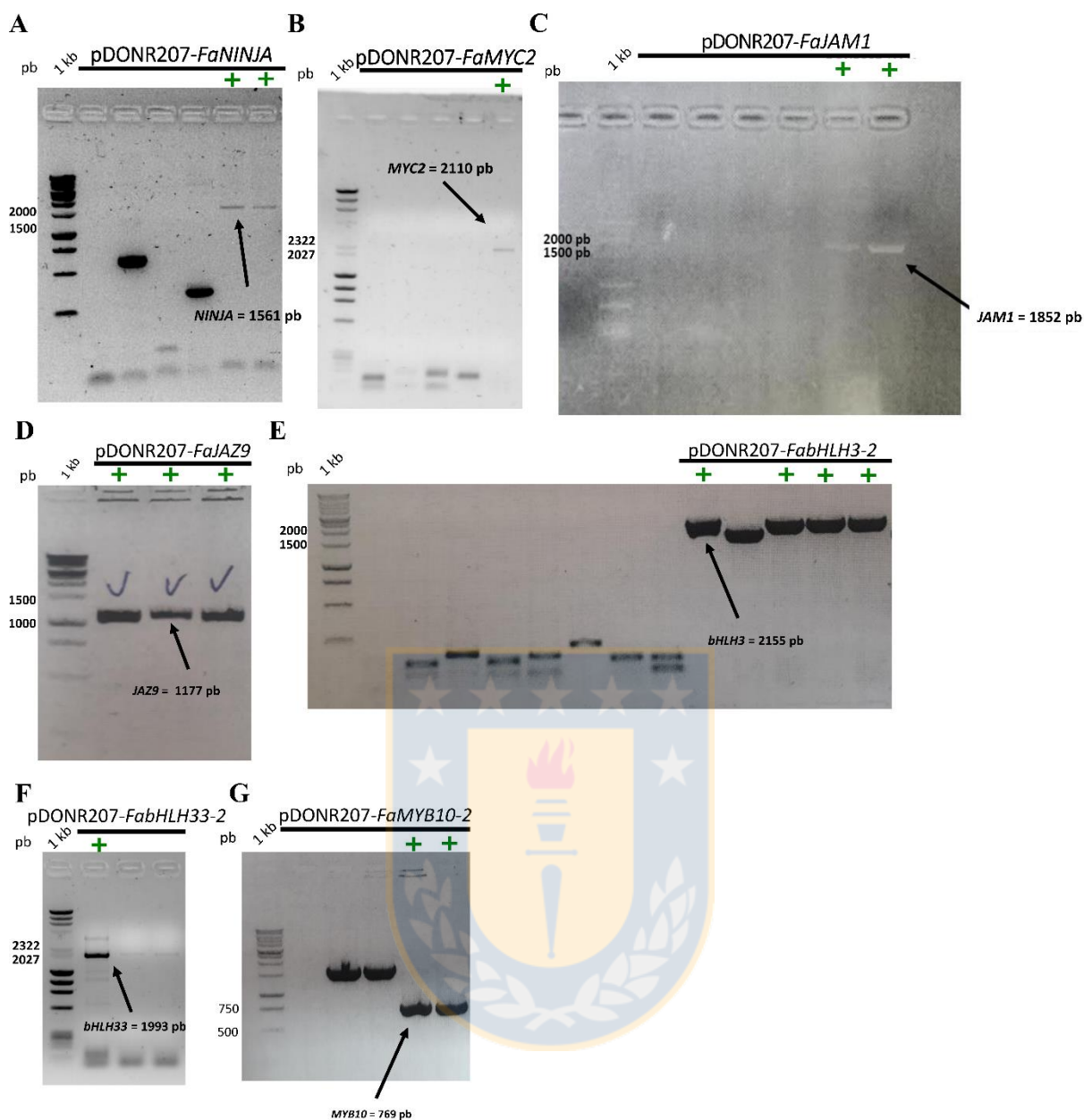


Fig. S5.4. Identificación de clones recombinantes para *FaNINJA*, *FaMYC2*, *FaJAM1*, *FaJAZ9*, *FabHLH3-2*, *FabHLH33-2* y *FaMYB10-2* en el vector dador pDONR207. Análisis mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones pDONR207-*FaNINJA* (A), -*FaMYC2* (B), -*FaJAM1* (C), -*FaJAZ9* (D), *FabHLH3-2* (E), -*FabHLH33-2* (F) y -*FaMYB10-2* (G). Los signos ‘+’ indican los clones positivos. 1 KB, marcador de peso molecular; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE; NINJA, NOVEL INTERACTOR OF JAZ; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

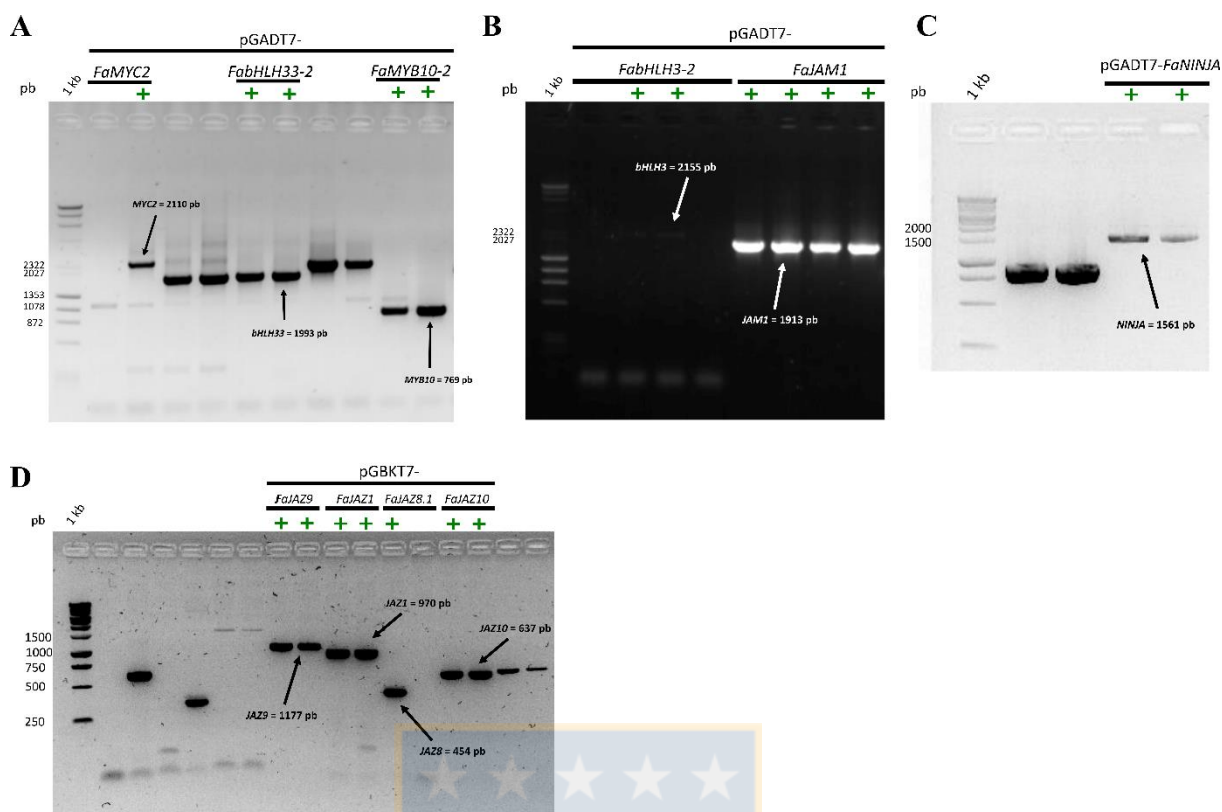


Fig. S5.5. Identificación de clones recombinantes para *FaMYC2*, *FabHLH33-2*, *FaMYB10-2*, *FabHLH3-2*, *FaJAM1*, *FaNINJA*, *FaJAZ1*, *FaJAZ8.1*, *FaJAZ9* y *FaJAZ10* en los vectores destino pGADT7 y pGBKT7. Análisis mediante PCR de colonias y electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones pGADT7-*FaMYC2*/*bHLH33*/*MYB10* (A) -*FabHLH3*/*JAM1* (B) -*FaNINJA* (C) y pGADT7-*FaJAZ1*/*FaJAZ8.1*/*FaJAZ9*/*FaJAZ10* (D). Los signos '+' indican los clones positivos. 1 KB, marcador de peso molecular; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE; NINJA, NOVEL INTERACTOR OF JAZ; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

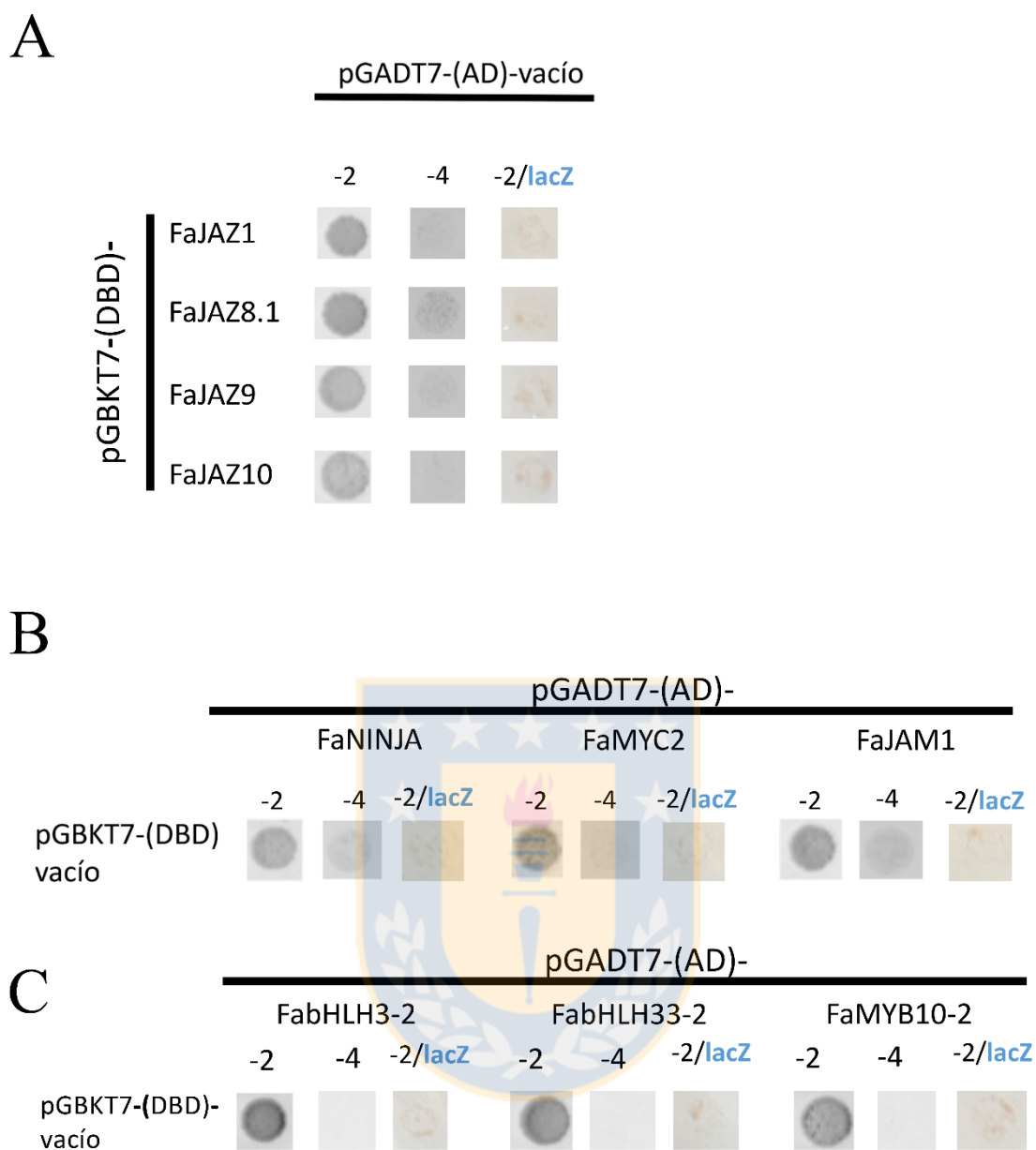


Fig. S5.6. Controles negativos de levaduras co-transformadas con construcciones y vectores destino para los ensayos de doble híbrido de levadura. Controles negativos de construcciones pGBKT7-(DBD)-FaJAZs y vector destino pGADT7-(AD)-vacío (A), pGADT7-(AD)-NINJA/MYC2/JAM1 y pGBKT7-(DBD)-vacío (B), pGADT7-(AD)-bHLH3/bHLH33/MYB10 y pGBKT7-(DBD)-vacío (C). -2, medio SDO -Leu-Trp; -4, medio SDO-Leu-Trp-Ade-His. AD, dominio de activación; DBD, dominio de unión al ADN; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MY2-like; *lacZ*, gen reportero β -galactosidasa.

Tabla S5.1. Secuencia de primers usados para el aislamiento de las secuencias codificantes de *NINJA*, *MYC2*, *JAM1*, *JAZ9*, *bHLH3-2*, *bHLH33-2* y *MYB10-2* de *Fragaria* × *ananassa*. En rojo y azul se indican los extremos attB1 y attB2, respectivamente, y en negro se indican las regiones específicas de hibridación con las secuencias codificantes. CDS, secuencia codificante; JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases.

CDS	Tamaño CDS (pb)	attB1 (5'→3')	attB2 (5'→3')	Tamaño total del amplicon (pb)
<i>FaNINJA</i>	1500	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGGAGGATGAGAGTGGACT TGAG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT TTGGCTCAGCTCTGAGGGGAGGC	1561
<i>FaMYC2</i>	2049	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGACGGACTACCGGATACC A	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT TTGGCTTATCTGGCCATCCCCAA GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC	2110
<i>FaJAM1</i>	1852	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGAAGATGGAGATGGGTTT AG	TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT TTGGCCTAACCAACTGATGACAAC GATT	1913
<i>FabHLH3-2</i>	2094	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGGCGACACCGCCACCGAG TAGT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT TTGGCTAAGAGTCAGACTGGGGTA TGAC	2155
<i>FabHLH33-2</i>	1932	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGGCCAATGGGACTCAA	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT TTGGCTTAACACTTACCAGCAATTT TCCAA	1993
<i>FaMYB10-2</i>	708	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTGATGGAGGGTTATTCGGTGT G	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT	769

FaJAZ9 1116 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA TTGGCTCATACGTAGGAGATGTTG
GGCTTGATGGAGAGGGATTTCTTGGG ACTAGATC
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTTATCTGGCATCCCCCACT
TTGGCTAATTCGTAGCTTGGGGAG 1177



Tabla S5.2. Números de accesoión de secuencias de aminoácidos de NINJA, MYC2/2-like, JAM1/2, JAZ9 de *Fragaria vesca* y bHLH3, bHLH33 y MYB10 de *Fragaria × ananassa* y sus ortólogos en varias especies, en GenBank (NCBI) y otras bases de datos. JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; pb, pares de bases.

Proteína	No. Accesoión	Proteína	Accessin
FvJAZ9	XP_011463182	FabHLH3	JQ989284
AtJAZ9	NP_177227	FvbHLH3	XP_004290663
MdJAZ13 ¹	MDP0000244580	AtTT8	CAC14865
MdJAZ14 ¹	MDP0000243322	MdbHLH3	ADL36597
VvJAZ11	XP_002282688	VvbHLH3	NP_001268182
SIJAZ5	XP_010318655	SlbHLH3	XP_010326368
FvNINJA	XP_004287452	FabHLH33	JQ989286
AtNINJA	NP_849467	FvbHLH33	XP_004308377
MdNINJA	XP_008374876	AtEGL3	NP_176552
VvNINJA	XP_002283979	MdbHLH33	ABB84474
SININJA	XP_004239269	VvbHLH33	XP_010661717
FvMYC2	XP_004300239	SlbHLH33	NP_001333920
FvMYC2-like	XP_004306627	FaMYB10	
AtMYC2	NP_174541	FaMYB10	EU155162
AtMYC3	NP_19448	FvMYB10	EU155163
AtMYC4	NP_193522	AtPAP1	NP_176057
AtMYC5	NP_199495	MdMYB10	EU518249
MdMYC2a ¹	MDP0000029168	VvMYB10	AB242302
MdMYC2b ¹	MDP0000136498	SIMYB10	AY348870
MdMYC2-like1 ¹	MDP0000242554		
MdMYC2-like2 ¹	MDP0000900024		
MdMYC2-like3 ¹	MDP0000442310		
VvMYC2 ²	GSVIVT0001315		

VvMYC2-like ²	GSVIVT0101965 9001
SIMYC2 ³	Solyc08g076930
FvJAM1	XP_004306657
FvJAM2	XM_011459681
AtJAM1	NP_566078
AtJAM2	NP_171634
AtJAM3	NP_193376
MdbHLH003-like1	XP_008372342
MdbHLH003-like2	NP_001287804
MdbHLH013	XP_008376082
MdbHLH013-like	XP_0083521181
VvbHLH003	XP_002282584
SlbHLH003	XP_004242355
SlbHLH003-like	XP_010321507
SlbHLH013-like	XP_004229991

¹ Base de datos de *Malus × domestica* (GDR, <https://www.rosaceae.org/>)

² Base de datos de *Vitis vinifera* (Grape genome database, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)

³ Base de datos de *Solanum lycopersicum* (SolGenomics Network, <https://www.solgenomics.net/>).

Tabla S5.3. Identidad de las secuencias de proteínas FaNINJA y sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre proteínas FaNINJA de *Fragaria* × ananassa con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. ×domestica*, *V. vinífera* y *S. lycopersicum*.

	FaNINJA
FvNINJA	96,19
AtNINJA	54,41
MdNINJA	77,46
VvNINJA	65,59
SININJA	56,62



Tabla S5.4. Identidad de las secuencias de proteínas FaMYC2 y FaMYC2-like con sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre proteínas MYC2 y MYC2-like de *F. × ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinífera* y *S. lycopersicum*.

	FaMYC2	FaMYC2-like
FaMYC2	---	38,32
FaMYC2-like	38,32	---
FvMYC2	99,56	38,78
FvMYC2-like	38,32	97,35
AtMYC2	57,36	43,72
AtMYC3	53,01	40,48
AtMYC4	55,88	40,39
AtMYC5	46,01	39,76
MdMYC2a	80,72	38,34
MdMYC2b	78,81	38,79
MdMYC2-like1	33,87	41,95
MdMYC2-like2	37,50	70,40
MdMYC2-like3	31,91	39,25
VvMYC2	33,51	30,54
VvMYC2-like	45,45	56,06
SIMYC2	65,09	39,46

Tabla S5.5. Identidad de las secuencias de proteínas FaJAM1/bHLH013 y FaJAM2/bHLH003 con sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre proteínas FaJAM1/bHLH013 y FaJAM2/bHLH003 de *Fragaria* × *ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinífera* y *S. lycopersicum*. JAM, JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-like.

	FaJAM1/bHLH013	FaJAM2/bHLH003
FaJAM1/bHLH013	---	---
FaJAM2/bHLH003	43,30	---
FvJAM1/bHLH013	99,03	43,51
FvJAM2/bHLH003	43,35	97,39
AtJAM1/bHLH017	51,48	42,68
AtJAM2/bHLH013	57,09	41,94
AtJAM3/bHLH003	42,38	57,59
MdbHLH003-like1	42,39	75,96
MdbHLH003-like2	41,77	74,75
MdbHLH013	79,28	45,15
MdbHLH013-like	79,12	44,95
VvbHLH003	43,28	61,43
SlbHLH003	41,04	57,11
SlbHLH003-like	58,89	43,22
SlbHLH013-like	64,78	44,91

Tabla S5.6. Identidad de las secuencias de JAZ9 de *F. × ananassa* con sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre la proteína FaJAZ9 de *F. × ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum*.

	FaJAZ9
FvJAZ9	99,19
AtJAZ9	38,04
MdJAZ14	64,33
VvJAZ11	47,40
SlJAZ5	46,47



Tabla S5.7. Identidad de las secuencias de proteínas FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 con sus ortólogos de otras especies. Identidad (%) entre proteínas FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 de *Fragaria × ananassa* con sus ortólogos en *F. vesca*, *A. thaliana*, *M. × domestica*, *V. vinifera* y *S. lycopersicum*.

	FabHLH3-2	FabHLH33-2	FaMYB10-2
FabHLH3 ¹	100	---	---
FvbHLH3	94,69	---	---
AtTT8	56,65	---	---
MdbHLH3	80,55	---	---
VvbHLH3	73,76	---	---
SlbHLH3	56,51	---	---
FabHLH33 ¹	---	99,62	---
FvbHLH33	---	97,51	---
AtEGL3	---	45,64	---
MdbHLH33	---	76,21	---
VvbHLH33	---	66,25	---
SlbHLH33	---	44,96	---
FaMYB10 ²	---	---	97,42
FvMYB10	---	---	94,44
AtPAP1/MYB75	---	---	44,20
MdMYB10	---	---	49,10
VvMYB10	---	---	43,56
SIMYB10	---	---	43,10

¹Secuencias reportadas por Schaart et al. 2013

²Secuencia reportada por Ling-Wang et al. 2010

Capítulo 6:

Discusión general

Los jasmonatos (JAs) son fitohormonas que regulan múltiples procesos frente a estrés biótico, abiótico, y procesos del desarrollo, así como biosíntesis de metabolitos secundarios en las plantas terrestres, y estos procesos son bien conocidos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Huang et al., 2016; C. Wasternack & Hause, 2013; Claus Wasternack, 2014; Yuan & Zhang, 2015). El ácido abscísico (ABA) es la principal fitohormona relacionada con el proceso de maduración, concretamente con la acumulación de antocianinas en frutos maduros de frutilla (Jia et al., 2011), sin embargo, el rol de otras fitohormonas como los JAs en el desarrollo y maduración de los frutos, como la frutilla, es limitado. Los JAs inducen la acumulación en la acumulación de antocianinas en *F. chiloensis* y *F. × ananassa* (Concha et al., 2013; Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018a; Shan, Zhang, Peng, Wang, & Xie, 2009), sin embargo, el mecanismo a través del cual regulan este proceso es desconocido.

Los niveles de metil jasmonato (MeJA) son elevados en estadios verdes de los frutos, y posteriormente disminuyen hacia la maduración (Gansser, Latza, & Berger, 1997), y los niveles de JA-Ile, anteriormente reportada como la molécula de JA bioactiva en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2009), mostraron el mismo patrón de acumulación en *F. × ananassa* (Fig. 2.2a-c; Garrido-Bigotes et al., 2018a), de forma similar a lo reportado para otros frutos no climatéricos como *V. vinifera* (Böttcher, Burbidge, di Rienzo, Boss, & Davies, 2015). Así mismo, la expresión de los genes de biosíntesis y de degradación de JA-Ile indicaron una disminución en la expresión durante el desarrollo y la maduración de los frutos (Fig. 2.3). Además, la aplicación de MeJA a frutos en estadio blanco indujo la acumulación de antocianinas en *F. × ananassa*, y al mismo tiempo se observó un incremento de JA-Ile, acompañado de una reducción de los niveles de ABA, junto con una disminución de la expresión del gen 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) (Fig. 2.5; Garrido-Bigotes et al., 2018a). Estos resultados sugieren que el aumento en el contenido de JA-Ile activa una vía alternativa para la acumulación de antocianinas, y un efecto antagónico con el ABA en *F. × ananassa* (Garrido-Bigotes et al., 2018a).

La vía de transducción de señales de los JAs está bien caracterizada en *Arabidopsis* (Chini, Gimenez-Ibanez, Goossens, & Solano, 2016). El incremento en los niveles de JA-Ile promueve la interacción del co-receptor CORONATINE-INSENSITIVE 1 (COI1) con los represores de la transcripción JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) (Sheard et al., 2010), que

son ubiquitinados y degradados por el proteasoma 26S (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007), dejando libres a los factores de transcripción (FTs) MYC2 que son reguladores maestro de las respuestas a JAs (Fernández-Calvo et al., 2011), y los cuales se relacionan con la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis* (Dombrecht et al., 2007; Lorenzo, Chico, Sánchez-Serrano, & Solano, 2004). Las proteínas represoras JAZ interaccionan con la proteína adaptadora NINJA (Pauwels et al., 2010) para la formación del complejo co-represor de los FTs MYC2, constituido por las proteínas TOPLESS (TPL) e histonas deacetilasas (HDAs) (Pauwels et al., 2010; Geyter, Gholami, Goormachtig, & Goossens, 2012). Además, otros reguladores actúan como antagonistas de los FTs MYC2 denominados JAM1/bHLH017, JAM2/bHLH013 y JAM3/bHLH003 (Nakata et al., 2013; Sasaki-Sekimoto et al., 2013), que también son dianas moleculares de las proteínas JAZ en *Arabidopsis* (Fonseca et al., 2014). Se caracterizaron los componentes de la vía de señalización de los JAs en *F. vesca* (Figs. , Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, & Figueroa, 2018b), cuyo genoma está representado en *F. × ananassa* (Liu, Poulsen, Davis, & Jenkins, 2016). Fueron identificadas un total de doce proteínas JAZs, la proteína adaptadora NINJA, dos FTs MYC, dos antagonistas JAMs y cuatro proteínas TPLs e HDAs (Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, & Figueroa, 2018b). Así mismo, fueron evaluados los niveles de expresión de estos genes en el desarrollo y maduración de frutos de *F. × ananassa*, con un perfil de disminución de la expresión hacia la maduración (Fig. 3.7), similar a lo observado para los niveles de JAs (Fig. 2.2, Garrido-Bigotes, Figueroa, Figueroa, & Figueroa, 2018a).

La percepción de los JAs comienza por la interacción COI1-JAZ mediado por JA-Ile (Sheard et al., 2010). La interacción depende de la existencia de dominios conservados en ambas proteínas, siendo los dominios LRR de COI1 y el dominio Jas de JAZs que contiene la secuencia de degron canónica LPIARK, permitiendo la unión en *Arabidopsis* (Sheard et al., 2010). Sin embargo, las proteínas AtJAZ7 y AtJAZ8 contienen una secuencia de degron degenerada, y no son degradadas por el proteasoma 26S (Shyu et al., 2012). Además, la interacción COI1-JAZ está mediada por el cofactor InsP₅ (Sheard et al., 2010). La proteína COI1 presentó una alta conservación de su secuencia de aminoácidos, con los dominios LRR altamente conservados en *F. × ananassa*, al igual que los residuos que median la interacción con las proteínas JAZ y el cofactor InsP₅ (Fig. 4.1). Por otro lado, las proteínas FaJAZ1, FaJAZ9 y FaJAZ10 reportadas mostraron un alto grado de conservación del dominio Jas, sin embargo, las secuencias de degron

que contienen fueron variables, siendo IPMQRK, VPQARK y LPIARK las reportadas, respectivamente (Figs. 4.2, 5.4). Por otro lado, FaJAZ8.1 no presentó secuencia de degron (Fig. 4.2), de igual forma a lo observado para FvJAZ8.1 y sus ortólogos en otras especies (Fig. 3.4). Curiosamente, la secuencia de degron IPMQRK no aparece en otras proteínas JAZ de *A. thaliana* o la rosácea *M. × domestica*, sin embargo, fue identificada en varias especies de los géneros *Fragaria*, *Rosa*, o *Rubus*, entre otros (Fig. 4.3), pertenecientes a la subfamilia Rosoideae (Xiang et al., 2017), sugiriendo que apareció tardíamente durante la evolución de esta subfamilia. Finalmente, se demostró que esta secuencia de degron de FaJAZ1 es funcional, mediante ensayos de interacción en doble híbrido de levadura (Y2H), para la interacción con FaCOI1 mediado por COR (Fig. 4.4), que es una fitotoxina análoga a JA-Ile (Staswick & Tiriyaki, 2004).

Las proteínas JAZ interactúan con la proteína adaptadora NINJA para la formación del complejo co-represor de las respuestas a JAs (Pauwels et al., 2010), y reprimen a los FTs MYC2 mediante interacciones proteína-proteína (Fernández-Calvo et al., 2011), aunque también tienen como dianas moleculares a los antagonistas JAM (Fonseca et al., 2014). La interacción NINJA-JAZ está mediada por los dominios C y TIFY en *Arabidopsis*, respectivamente (Pauwels et al., 2010). FaNINJA mostró un alto grado de conservación del dominio C (Fig. 5.1), y FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10 exhibieron el dominio TIFY conservado (Fig. 4.2, 5.4), los cuales permiten la unión de ambas proteínas (Pauwels et al. 2010). Los ensayos de interacción mostraron la conservación funcional de las interacciones FaNINJA-JAZ1/JAZ9/10, mientras que no se observó interacción FaNINJA-JAZ8.1 (Fig. 5.6), similar a lo reportado para los ortólogos de *Arabidopsis* (Pauwels et al., 2010). Por otro lado, las proteínas JAZ reprimen a los FTs MYC mediante unión proteína-proteína, a través del dominio Jas y el dominio JID, respectivamente (Fernández-Calvo et al., 2011). Estos dominios estaban altamente conservados en FaJAZ1, FaJAZ8.1, FaJAZ9, FaJAZ10, y FaMYC2, FaMYC2-like (Figs. 4.2, 5.2), siendo observada interacción de las FaJAZs con MYC2 (Fig. 5.6), de acuerdo a lo reportado anteriormente por Fernández-Calvo et al. (2011). Así mismo, el dominio Jas de los represores JAZ permite la unión con el dominio JID presente en las proteínas antagonistas JAMs (Fonseca et al., 2014), el cual mostró una alta conservación en FaJAM1 y FaJAM2 (Fig. 5.3). Los ensayos Y2H indicaron una conservación en la funcionalidad del efecto represor de las proteínas FaJAZs sobre la proteína FaJAM1 (Fig. 5.6), de acuerdo a lo reportado en los ortólogos de *A. thaliana* (Fonseca et al., 2014). La evaluación de las interacciones proteína-

proteína de los represores FaJAZs con FaCOI1, y con los componentes de la vía de señalización de los JAs (FaNINJA, FaMYC2 y FaJAM1) sugieren que los represores FaJAZ son reguladores centrales en la vía de transducción de señales en frutilla (Figs. 4.4, 5.6).

Las proteínas JAZs también tienen efectos represores sobre otros FTs, como los del complejo MBW, que regulan la biosíntesis de PAs y antocianinas en *Arabidopsis* (Goossens, Mertens, Goossens, & Napier, 2017; Qi et al., 2011). Los FTs AtTT8, AtEGL3 y AtPAP1/MYB75 tienen sus ortólogos en *F. × ananassa*, denominados bHLH3, bHLH33 y MYB10, respectivamente, y que controlan la expresión de enzimas implicados en la biosíntesis de PAs y antocianinas (Schaart et al., 2013). El dominio bHLH de AtTT8 y AtEGL3 media la interacción con el dominio Jas de las proteínas JAZ, mientras AtPAP1/MYB75 contiene el dominio CT implicado en esta interacción (Qi et al., 2011). Se encontró un alto grado de conservación de estos dominios en los ortólogos FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 (Fig. 5.5), sin embargo, las interacciones proteína-proteína (Fig. 5.7) mostraron diferencias respecto a los ortólogos de *Arabidopsis* (Qi et al., 2011). FabHLH3 es uno de los activadores de la transcripción de los genes ANR y LAR para la biosíntesis de PAs (Schaart et al., 2013), y resultó estar regulado por FaJAZ8.1, FaJAZ9 y FaJAZ10, no así por FaJAZ1 (Fig. 5.7), mientras que si es un FT diana en ensayos Y2H de *Arabidopsis* (Qi et al., 2011). Por otra parte, FaMYB10 forma parte del complejo transcripcional que induce la expresión de los genes que codifican para los enzimas ANS y UFGT, que catalizan la biosíntesis de antocianinas (Schaart et al., 2013). En *Arabidopsis*, JAZ1 y JAZ8 interaccionan con el ortólogo AtPAP1/MYB75 (Qi et al., 2011), y en *F. × ananassa*, los ortólogos FaJAZ1, FaJAZ8.1, además de FaJAZ9 mostraron unión proteína-proteína con FaMYB10-2 (Fig. 4.4). Finalmente, bHLH33 ha sido propuesto como regulador de la expresión de genes que codifican para los enzimas de la ruta de biosíntesis de antocianinas (Lin-Wang et al., 2014) y ha sido caracterizado en *F. × ananassa* (Schaart et al., 2013), sin embargo, mediante clonación fue identificado un FT bHLH33-2 que podría corresponderse con una isoforma, ya que aunque mostró mayor tamaño de secuencia, la identidad fue cercana al 100%, con la anteriormente reportada en *F. × ananassa* (Schaart et al., 2013). En *Arabidopsis*, EGL3 es regulado por JAZ1, JAZ8, JAZ9 y JAZ10 (Qi et al., 2011), sin embargo, su ortólogo FabHLH33-2 únicamente mostró interacción con FaJAZ1 (Fig. 5.7). Los resultados obtenidos para la interacción FaJAZs con los FTs FabHLH3-2, FabHLH33-2 y FaMYB10-2 indicaron regulación mediante unión proteína-proteína del complejo MBW, lo que

sugiere que las proteínas JAZs tienen efectos represores sobre la biosíntesis de PAs y antocianinas en *F. × ananassa*.

Las flores y frutos de *F. × ananassa* en estadio verde mostraron un alto contenido en JA-Ile (Fig. 6.1A, Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018a), el mismo patrón observado para la disminución en el contenido de PAs, y opuesto al aumento en el contenido de ABA y antocianinas en frutos maduros (Fig. 6.1A, Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018a,b; Jia et al. 2011; Schaart et al. 2013). Por otro lado, la expresión de los represores JAZ, FTs MYC2 y los antagonistas JAMs fue mayor en estadios tempranos del desarrollo (Garrido. Bigotes et al. 2018b). Los niveles de JA-Ile elevados promueven la degradación de proteínas JAZ, mediada por la interacción con COI1 en *Arabidopsis* (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007), y en *F. × ananassa*, FaJAZ1, FaJAZ9 y FaJAZ10 contienen las secuencias de degron IPMQRK, VPQARK y LPIARK necesarias para que ocurra la degradación (Fig. 4.2), al igual que en *F. vesca* (Garrido-Bigotes et al. 2018b), sugiriendo que estos serían degradados en los estadios tempranos de desarrollo del fruto, ya que se detectaron interacciones proteína-proteína entre FaJAZ1 y FaJAZ10 con COI1 (Figs. 4.4, 6.1B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que únicamente FaJAZ8.1 estaría presente en estadios tempranos del desarrollo, posiblemente inhibiendo la vía de señalización de los JAs, por las interacciones proteína-proteína observadas con FaMYC2 (Figs. 5.6, 6.1B). Por otra parte, las interacciones observadas de las proteínas FaJAZs con la proteína JAM1 (Figs. 5.6, 6.1B), disminuirían el efecto antagonístico sobre los FTs MYC2. En estadios de fruto maduro se observaron niveles bajos de JAs, al igual que los niveles de expresión de las proteínas FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ9, mientras que para FaJAZ10 no se observó expresión (Fig. 3.7, Garrido-Bigotes, Figueroa, & Figueroa, 2018b), sugiriendo que la vía de señalización de los JAs estaría menos activa que en estadios tempranos del desarrollo. Por otra lado, en estadios tempranos de desarrollo, los niveles de expresión de FabHLH3 son elevados (Schaart et al. 2013), y el cual es una diana molecular de FaJAZ8.1 (Figs. 5.7, 6.1C), sugiriendo una inhibición de la actividad transcripcional de FabHLH3-2, sin embargo, en esta etapa inicial del desarrollo los niveles de PAs son altos (Fig. 6.1A). Los FTs MYB9 y MYB11 son reguladores de la biosíntesis de PAs (Schaart et al. 2013), y en la rosácea *M. × domestica* son reclutados por el FT bHLH3, el cual interacciona con la proteína JAZ2 para inhibir la biosíntesis de PAs, mientras que interacciones directas entre las proteínas JAZ con MYB9 y

MYB11 no han sido observadas (An et al. 2015). Sin embargo, los ortólogos FaMYB9 y FaMYB11 también regulan la biosíntesis de PAs en *F. × ananassa* (Schaart et al. 2011), y la debería ser evaluada su interacción con las proteínas JAZs, debido a la especificidad de estos represores (Chini et al. 2016). Por otro lado, FabHLH33 ha sido reportado como regulador dual para la biosíntesis de PAs y antocianinas, no estando clara su función mayoritaria (Schaart et al. 2013, Lin-Wang et al. 2014), y la evaluación de la interacción con los represores JAZ, únicamente mostró unión a FaJAZ1 (Fig. 5.7, 6.1C). FaMYB10 regula la biosíntesis de antocianinas a través del complejo MBW (Lin-Wang et al., 2014; Schaart et al., 2013), y su expresión es mayoritaria en frutos maduros (Medina-Puche et al., 2014), por tanto, en estadios tempranos el represor FaJAZ8.1 podría estar inhibiendo la activación de la expresión de los genes de biosíntesis de antocianinas, mientras que en frutos maduros debido a la alta expresión de FaMYB10, y los bajos niveles de expresión de FaJAZ1, FaJAZ8.1 y FaJAZ9, la represión sería menor y se permitiría la activación de la biosíntesis de antocianinas. Por lo tanto, las proteínas JAZ podrían tener un rol regulador de la biosíntesis de PAs y antocianinas durante el desarrollo y la maduración de frutos de *F. × ananassa*, sin embargo, investigaciones adicionales serían necesarias para determinar el rol de la vía de señalización de los JAs en la biosíntesis de estos compuestos flavonoides, tales como la función represores de las proteínas JAZ sobre otros FTs del complejo MBW tales como MYB9, MYB11 relacionados con la biosíntesis de PAs, y MYB1, que actúa como inhibidor del del complejo de FTs que regulan la biosíntesis de antocianinas. Adicionalmente, sería importante determinar cuales de los FTs anteriormente mencionados, son dianas moleculares de las proteínas represoras JAZ descritas anteriormente para *F. vesca* (Garrido-Bigotes et al. 2018b), y representadas en el genoma de *F. × ananassa* (Liu, Poulsen, & Davis, 2016).

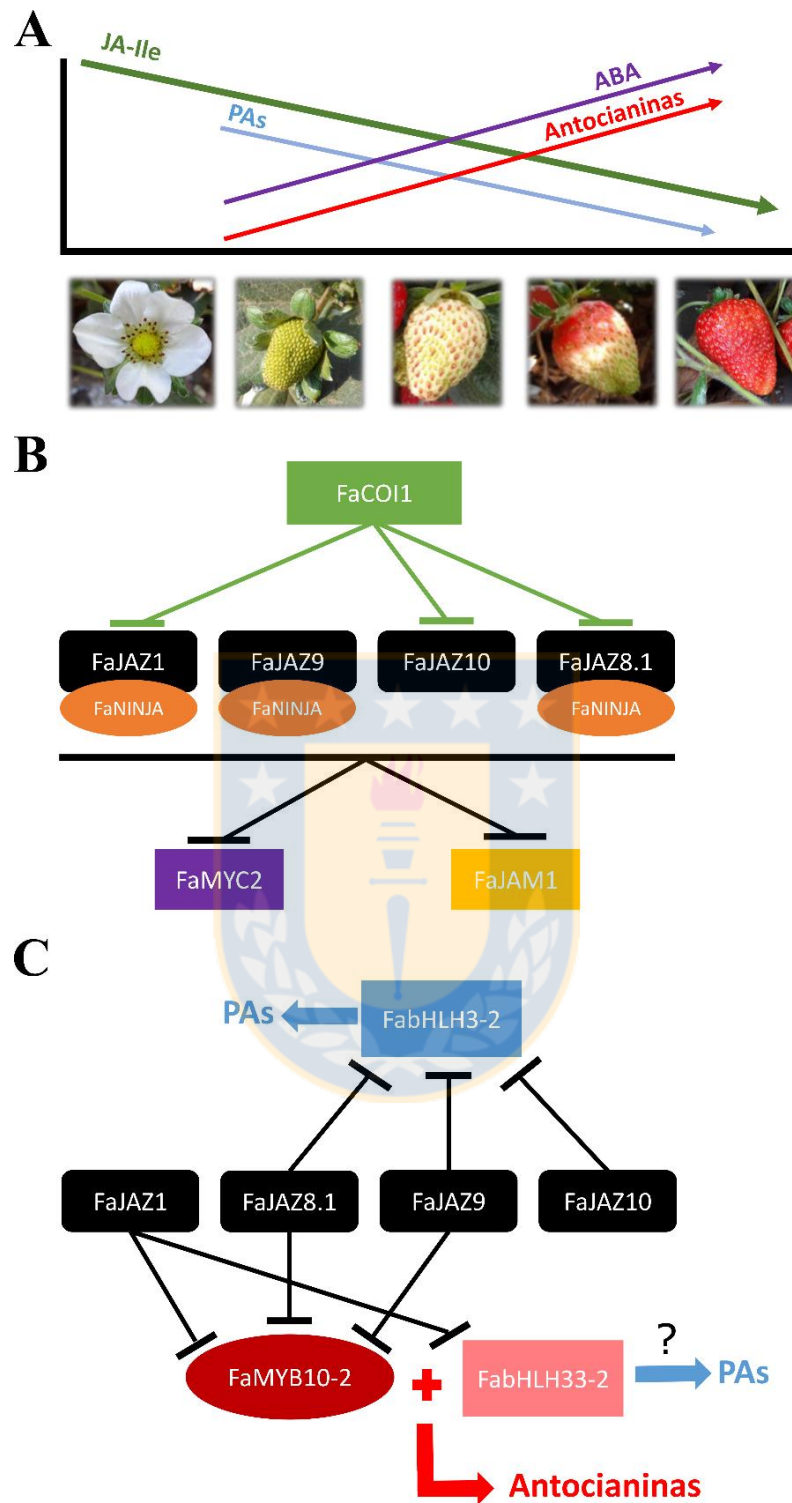


Fig. 6.1. Modelo de las variaciones de jasmonatos durante el desarrollo y la maduración, e interacciones de las proteínas JAZ con los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos y factores de transcripción del complejo MBW. Variaciones del contenido de

jasmonatos, ácido abscísico, proantocianidinas y antocianinas durante el desarrollo y maduración de frutos de *Fragaria × ananassa* (A). Interacciones proteína-proteína de los represores JAZ con COI1, NINJA, MYC2 y JAM1 (B), y con factores de transcripción FabHLH3, FabHLH33 y FaMYB10 de *Fragaria × ananassa* (C). ABA, ácido abscísico; COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1; JA-Ile, jasmonate isoleucine; JAZ, JASMONATE ZIM-DOMAIN; JAM, JASMONATE ASSOCIATED-MYC2-like; NINJA, Novel Interactor of JAZ; PAs, proantocianidinas.



Conclusiones generales

- El contenido de jasmonatos disminuye con el transcurso del desarrollo y la maduración de frutos de *Fragaria* × *ananassa*. Los niveles de expresión de los genes del metabolismo de jasmonatos disminuye de acuerdo a los niveles de jasmonatos.
- Los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos (JAZs, NINJA, MYC2s y JAMs) están conservados en *F. vesca*, y su expresión es mayoritaria en floración y estadios de desarrollo temprano de frutos de *Fragaria* × *ananassa*.
- Las proteínas JAZ interactúan con el co-receptor COI1 mediado por coronatina. El represor JAZ1 de *Fragaria* × *ananassa* contiene una secuencia de grom no canónica funcional que permite la percepción de los jasmonatos, mediada por coronatina.
- Los represores JAZ interactúan con los componentes de la vía de señalización de los jasmonatos (NINJA, MYC2 y JAM1), y los factores de transcripción del complejo MBW (bHLH3-2, bHLH33-2 y MYB10-2) de *Fragaria* × *ananassa*.

Referencias generales

- An, X.-H., Tian, Y., Chen, K.-Q., Liu, X.-J., Liu, D.-D., Xie, X.-B., ... Hao, Y.-J. (2015). MdMYB9 and MdMYB11 are involved in the regulation of the JA-induced biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apples. *Plant & Cell Physiology*, 56(4), 650-662. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu205>.
- Böttcher, C., Burbidge, C. A., di Rienzo, V., Boss, P. K., & Davies, C. (2015). Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(7), 618-627. <https://doi.org/10.1111/jipb.12321>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, Andrea, Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Concha, C. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Oñate, F. A., Schwab, W., & Figueroa, C. R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 70, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.008>
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2225-2245. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048017>
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... Solano, R. (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701-715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., ... Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>

- Fonseca, S., Fernández-Calvo, P., Fernández, G. M., Díez-Díaz, M., Gimenez-Ibanez, S., López-Vidriero, I.,... Solano, R. (2014). bHLH003, bHLH013 and bHLH017 Are New Targets of JAZ Repressors Negatively Regulating JA Responses. *PLOS ONE*, 9(1), e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9608940>
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N. E., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate signalling pathway in strawberry: Genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening. *PLOS ONE*, 13(5), e0197118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197118>
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P. M., & Figueroa, C. R. (2018). Jasmonate Metabolism and Its Relationship with Abscisic Acid During Strawberry Fruit Development and Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(1), 101-113. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9710-x>
- Geyter, N. D., Gholami, A., Goormachtig, S., & Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17(6), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
- Goossens, J., Mertens, J., Goossens, A., & Napier, R. (2017). Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1333-1347. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw440>
- Huang, Z., Jin, S.-H., Guo, H.-D., Zhong, X.-J., He, J., Li, X., ... Chen, Q.-B. (2016). Genome-wide identification and characterization of TIFY family genes in Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and expression profiling analysis under dehydration and cold stresses. *PeerJ*, 4, e2620. <https://doi.org/10.7717/peerj.2620>
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177311>
- Lin-Wang, K., McGhie, T. K., Wang, M., Liu, Y., Warren, B., Storey, R., ... Allan, A. C. (2014). Engineering the anthocyanin regulatory complex of strawberry (*Fragaria vesca*). *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00651>

- Liu, B., Poulsen, E. G., Davis, T. M., & Jenkins, G. (2016). Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids. *Genome*, *59*(2), 79-86. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0116>
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, *16*(7), 1938-1950. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., Hoffmann, T., Ring, L., Rodríguez-Franco, A., ... Blanco-Portales, R. (2014). MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany*, *65*(2), 401-417. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert377>
- Nakata, M., Mitsuda, N., Herde, M., Koo, A. J. K., Moreno, J. E., Suzuki, K., ... Ohme-Takagi, M. (2013). A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. *The Plant Cell*, *25*(5), 1641-1656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., ... Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, *464*(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., ... 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>
- Sasaki-Sekimoto, Y., Jikumaru, Y., Obayashi, T., Saito, H., Masuda, S., Kamiya, Y., ... Shirasu, K. (2013). Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *163*(1), 291-304. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
- Schaart, J. G., Dubos, C., Romero De La Fuente, I., van Houwelingen, A. M. M. L., de Vos, R. C. H., Jonker, H. H., ... Bovy, A. G. (2013). Identification and characterization of MYB-

- bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *The New Phytologist*, *197*(2), 454-467. <https://doi.org/10.1111/nph.12017>
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3849-3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., ... Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, *468*(7322), 400-405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C. L., Cooke, T. F., Sheard, L. B., Moreno, J. E., ... Howe, G. A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(2), 536-550. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093005>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The Oxylin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(8), 2117-2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- 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. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, Claus. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development — Applied aspects. *Biotechnology Advances*, *32*(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.009>
- Xiang, Y., Huang, C.-H., Hu, Y., Wen, J., Li, S., Yi, T., ... Ma, H. (2017). Evolution of Rosaceae Fruit Types Based on Nuclear Phylogeny in the Context of Geological Times and Genome Duplication. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(2), 262-281. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw242>

Yuan, Z., & Zhang, D. (2015). Roles of jasmonate signalling in plant inflorescence and flower development. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 44-51.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.024>



ANEXO A: Publicaciones

- **Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P. M., Figueroa, C. R. (2018). “Jasmonate metabolism and its relationship with abscisic acid during strawberry fruit development and ripening”.** Journal of Plant Growth Regulation. DOI: 10.1007/s00344-017-9710-x.
- **Garrido-Bigotes, A., Figueroa, N.E., Figueroa, P.M. & Figueroa, C.R. (2018). “Jasmonate signalling pathway in strawberry: Jasmonate signalling pathway in strawberry: genome-wide identification, molecular characterization and expression of JAZs and MYCs during fruit development and ripening”.** PlosOne 13: e0197118. DOI: 10.1371/journal.pone.0197118.
- **Delgado, L.D., Zúñiga, P.E., Figueroa, N.E., Pastene, E., Escobar-Sepúlveda, H.F., Figueroa, P.M., Garrido-Bigotes, A., Figueroa, C.R. (2018). “Application of a JA-Ile Biosynthesis Inhibitor to Methyl Jasmonate-Treated Strawberry Fruit Induces Upregulation of Specific MBW Complex-Related Genes and Accumulation of Proanthocyanidins”.** Molecules 23: 1433. DOI: 10.3390/molecules23061433.
- **Valenzuela-Riffo, F., Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P.M., Morales-Quintana, L. & Figueroa, C.R. (2018). “Structural analysis of the woodland strawberry COI1-JAZ1 co-receptor for the plant hormone jasmonoyl-isoleucine”.** Journal of Molecular Graphics and Modelling 85: 250-261. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.09.004.

ANEXO B: Participaciones en congresos y simposios

- **2018: Garrido-Bigotes, A.***, Solano, R., Figueroa, P., Figueroa, C.R., Torrejón, M. “**A new non-canonical degron in *Fragaria* JAZ proteins shows functionality for jasmonate perception**”. Sesión Póster. En: Cuarto Congreso “Poster-Day”, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- **2018: Garrido-Bigotes, A.**, Figueroa, N.E., Figueroa, P.M., Figueroa, C.R.* “**Molecular characterization of the jasmonate (JA) metabolism and JA signalling-related components in developing strawberry fruit**”. Sesión Póster. En: Tahoe City, Plant Signaling: Molecular Pathways and Network Integration (A4). Tahoe City, CA, USA. 21-24 enero de 2018. Poster No. 1010.
- **2017: Islas, J.***, Zúñiga, P.E., Mujica, J., Pimentel, P., Salvatierra, A., **Garrido-Bigotes, A.**, Figueroa, C.R. “**Determinación del rol de los genes *FaCOII*, *FaJAZ1* y *FaMYC2* en la maduración de la frutilla: avances en la agroinfiltración de frutos de *Fragaria* × *ananassa***”. Sesión Póster. En: XIII Jornada de Investigación y Postgrado 2017 de la Universidad de Talca.
- **2017: Valenzuela-Riffo F.***, **Garrido-Bigotes A.**, Figueroa P., Morales-Quintana L., Figueroa C. “***In silico* molecular analysis of the jasmonoyl-isoleucine putative receptors in *Fragaria vesca***”. Sesión Póster. En: XII Reunión de Biología Vegetal, Villarrica (Chile).
- **2017: Garrido-Bigotes A.**, Valenzuela-Riffo F., Torrejón M., Solano R., Figueroa P.*, Morales Quintana L., Figueroa C. “**Structural and interaction studies on the COII-JAZ co-receptor for jasmonoyl-isoleucine in *Fragaria* × *ananassa* reveal a new functional JAZ degron in plants**”. Sesión Oral. En: XII Reunión de Biología Vegetal. Villarrica (Chile).
- **2016: Garrido-Bigotes A.**, Figueroa P., Figueroa C.* “**Toward understanding the role of jasmonates during development and ripening of strawberry fruit**” Sesión Oral. En: XI Reunión de Biología Vegetal, Termas de Chillán (Chile).
- **2016: Delgado, L.**, Figueroa, N., Pastene, E., **Garrido-Bigotes, A.***, Figueroa, P., Figueroa, C. “**Inhibition of bioactive jasmonate biosynthesis in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruit: effects on anthocyanins and proanthocyanidins**”

accumulation". Sesión Póster. En: XI Reunión de Biología Vegetal. Termas de Chillán (Chile).

- **2016: Garrido-Bigotes, A.***, Figueroa P., Figueroa C. "**Oxylipins levels and expression of jasmonate responsive genes during development and ripening of strawberry fruit**". Sesión Oral. En: VIII International Strawberry Symposium. Québec (Canadá).
- **2015: Garrido, A.***, Figueroa, P., Figueroa, C. "**Jasmonate profiling and expression of its signaling components during fruit development and ripening in the non-climacteric strawberry**". Sesión Póster. En: X Reunión de Biología Vegetal de Chile. Valdivia (Chile).
- **2014: Garrido, A.***, Figueroa, P., Figueroa, C. "**Jasmonate signalling pathway during development and ripening of strawberry fruit: preliminary results**". Sesión Póster. En IX Reunión de Biología Vegetal de Chile. La Serena (Chile).

*Expositor del trabajo

