UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Audrey Christina do Nascimento

Pelotas, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Audrey Christina do Nascimento

Pelotas/ 2018

Audrey Christina do Nascimento

Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profa. Dra. Vanessa Galli

Orientador do Estágio: Ms. Rosane Lopes Crizel

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N244i Nascimento, Audrey Christina do

Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (Fragaria x ananassa Duch.) / Audrey Christina do Nascimento ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2018.

51 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Maturação. 2. Estresses abióticos. 3. Plantas. 4. Estresse osmótico. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 634.75

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Pelotas, 2018

Audrey Christina do Nascimento

Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27 de Novembro de 2018

Banca examinadora:

Profª. Drª. Vanessa Galli (Orientador), Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Drª. Isabel Lopes Vighi, Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Ms.ª Rosane Lopes Crizel, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

M.e Frederico Schmitt Kremer, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Pelotas, 2018

Dedico este trabalho a minha Oma (*in memorium*), que certamente teria muito orgulho de ver sua netinha tornar-se uma cientista

Agradecimentos

Agradeço a Deus, ao Universo ou a qualquer força maior que tenha conspirado (ou não) ao meu favor durante esse processo.

A minha mãe, Áurea, por todo amor, apoio e principalmente pelo “colinho de mãe” e palavras de incentivo.

Ao meu pai, Ferdinando, pela confiança e por possibilitar que eu realizasse o sonho de fazer uma graduação.

Ao Leon, pela sensibilidade ao entrar na minha vida e permanecer nela com abraços de conforto sempre que preciso.

A cidade de Pelotas e a todas as pessoas incríveis que conheci por aqui, em especial, a minha colega e amiga Maria Clara pela cumplicidade dentro e fora de aula.

A minha orientadora, professora Dra. Vanessa Galli, pelos ensinamentos que contribuíram muito a minha formação acadêmica; por acreditar em mim, e, sobretudo, por ser quase uma mãe aos seus orientados. És, a meu ver, um exemplo de profissional.

A minha orientadora de estágio Rosane e também, a Isabel por me ensinarem técnicas, me socorrerem nos “perrengues” e, ainda, pela amizade. E também aos meus demais colegas do Grupo de Pesquisa em Genômica Vegetal, pelo apoio e pelas conversas nos intervalos entre experimentos.

Aos professores da Biotecnologia, por todos os conhecimentos transmitidos e por fazerem despertar, ainda mais, meu amor pela ciência.

A Universidade Federal de Pelotas e aos órgãos de fomento pela concessão de bolsas.

E a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui,

Muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

- George Bernard Shaw

Resumo

DO NASCIMENTO, Audrey Christina. **Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)** 51f**.** 2018**.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O morango é um pseudofruto amplamente consumido e apreciado, devido a características como aroma, sabor, além da presença de compostos antioxidantes. Apesar do alto valor agregado atribuído a esse produto, alguns fatores mostram-se limitantes para a produtividade dessa espécie tais como estresses de origem abiótica, em especial, estresse osmótico. Além disso, os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de amadurecimento deste pseudofruto ainda precisam ser elucidados visando o desenvolvimento de estratégias para controlar deste processo, reduzindo assim, perdas pós-colheita. Desta forma, faz-se necessária a pesquisa de fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes responsáveis por mecanismos de resposta a estes estresses e pelo processo de maturação. O presente trabalho objetivou identificar novas sequências codificadoras de proteínas *Fa*WRKY em morango e analisar o padrão de expressão destes genes em pseudofrutos de morangueiros em diferentes estádios de desenvolvimento e sob condições de estresse osmótico. Para tanto, foi utilizado um transcriptoma para a busca por genes homólogos descritos na espécie não domesticada (*Fragaria vesca*). Foram obtidas 64 sequências, as quais foram confirmadas pela presença de domínios característicos desta família gênica, e suas relações filogenéticas preditas utilizando ferramentas de bioinformática. A análise por RT-qPCR, revelou uma possível relação entre genes *Fa*WRKY e o amadurecimento de frutos de morango, e a análise de expressão *in silico* revelou os prováveis genes envolvidos na resposta a estresses osmóticos.

Palavras-chave: maturação, estresses abióticos; plantas; estresse osmótico.

Abstract

DO NASCIMENTO, Audrey Christina. **Identification and characterization of the expression of genes coding for WRKYs transcription factors in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.)** 2018. 51s. Term paper (Bachelor of Biotechnology) - Technology Development Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Strawberry is a widely consumed and appreciated pseudofruit, due to characteristics such as aroma, flavor, in addition to the presence of antioxidant compounds. Despite the high added value attributed to this product, some factors are limiting to the production of this species such as abiotic stresses, especially osmotic stress. In addition, the biochemical and molecular mechanisms involved in the ripening process of this pseudofruit still need to be elucidated in order to develop maturation control approaches, to reduce post-harvest losses. Therefore, it is necessary to search for transcription factors involved in the expression of genes responsible for mechanisms of stress response and for ripening. The present work aimed to identify new sequences coding for *Fa*WRKY proteins in strawberry and to analyze the expression pattern of these genes in strawberry pseudofruits at different stages of development and under osmotic stress conditions. For this purpose, a transcriptome was to search for homologous genes from the wild specie (*Fragaria vesca*). It was obtained 64 sequences, which were confirmed by the presence of characteristic domains of this gene family, and the phylogenetic relationships predicted using bioinformatics tools. Analysis by RT-qPCR revealed a possible relationship between *FaWRKY* genes and strawberry ripening, and the in silico expression analysis revealed the putative genes involved in the response to osmotic stresses.

Keywords: maturation, abiotic stresses; plants; osmotic stress.

Lista de Figuras

Figura 1 Organização dos diferentes padrões (porções/regiões) em 64 genes da família gênica das WRKYs presentes em *F. ananassa*.....36

Figura 2 Estrutura dos éxons-íntrons dos 64 genes da família gênica das WRKYs presentes em *F. ananassa*.....37

Figura 3 Análise filogenética de genes *WRKY* de morango. 39

Figura 4 Mapa de cor (*Heat map*) mostrando a expressão de fatores de transcrição do tipo WRKY em frutos submetidos a condições de estresse osmótico. 41

Figura 5 Eletroforese em gel de agarose (X%) apresentando a amplificação dos genes *FaWRKYs.* 45

Figura 6 Análise da expressão de genes que expressam para fatores de transcrição do tipo WRKYs identificadas em morangos em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento. 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 Sequência de *primers* gerados a partir das sequências selecionadas de WRKYs em morango.....30

Tabela 2 Informações sobre as sequências de *WRKYs* identificadas em *F. ananassa*.....33

Tabela 3 Contagem de *reads* nas sequencias putativas em *F. ananassa*.....42

Tabela 4 Leitura da concentração de RNAs no NanoVue Plus (Healthcare Life Sciences).....44

Sumário

Agradecimentos **6**

Resumo **8**

Lista de Figuras **10**

Lista de Tabelas **11**

1 INTRODUÇÃO **13**

2 OBJETIVOS **14**

Objetivos específicos 14

3 **REFERENCIAL TEÓRICO** 15

3.1. O morango 15

3.2. Estresses abióticos 16

3.3. Maturação de frutos 17

3.4. Fatores de transcrição WRKY 18

3.5. O papel das proteínas WRKYs na resposta a estresses abióticos 20

3.6. O papel das proteínas WRKYs durante o desenvolvimento da planta e no amadurecimento e senescência de frutos 21

3.7. mRNA-Seq 22

3.8. PCR em tempo real - (RT-qPCR) 23

4 **MATERIAIS E MÉTODOS** 26

4.1. Identificação dos genes WRKY em *Fragaria x ananassa* 26

4.2. Predição de exons e introns 26

4.3. Análise filogenética 26

4.4. Análise de expressão in silico utilizando bancos de mRNA-Seq 27

4.5. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real 27

4.5.1 Obtenção das amostras biológicas 27

4.1.1 Isolamento de RNA e síntese de cDNA 28

4.1.2 Desenho dos *primers* 28

4.1.3 Amplificação dos genes *FaWRKY* por PCR 29

4.1.4 Reações de PCR em tempo real 30

5 **RESULTADOS** 31

5.1. Identificação e caracterização de FaWRKYs 31

5.2. Análise da expressão gênica de *FaWRKYs* 38

6 **CONCLUSÃO** 47

7 **REFERÊNCIAS** 48

1 INTRODUÇÃO

Durante o meu quinto semestre do curso de Biotecnologia, ingressei como estagiária de iniciação científica no Grupo de Pesquisa em Genômica Vegetal, sob orientação da professora Drª. Vanessa Galli. Dentre os projetos de pesquisa do grupo, fui bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) no projeto 'Identificação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos processos de amadurecimento e de biofortificação de frutos de morango submetidos a estresses osmóticos' e novamente bolsista na prorrogação do mesmo, dessa vez pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS).

Foi nesse período como bolsista de iniciação científica que tive a possibilidade de estudar a família gênica das proteíno-quinases dependentes de cálcio (CDPKs) presentes em morango, responsáveis pelo amadurecimento, bem como resposta a estresses em espécies vegetais e, posteriormente, com o processo de elaboração e execução do presente Trabalho de Conclusão de Curso, passei a estudar fatores de transcrição do tipo WRKY que se relacionam a expressão de genes que codificam a inúmeras proteínas, dentre elas as CDPKs.

O morangueiro, a planta modelo utilizada, apresenta uma alta demanda em sua produção, no entanto é acometido por condições desfavoráveis, chamadas de estresses, que são, principalmente, de origem osmótica e afetam a rentabilidade dos frutos. Dessa forma, devido a possível ligação das WRKYs com genes relacionados à resposta a essas condições, torna-se imprescindível o estudo das mesmas como forma de elucidar tal mecanismo. Além disso, o amadurecimento do morango é um importante fator a ser considerado para sua comercialização e, mais uma vez, as WRKYs podem estar relacionadas a expressão de genes responsáveis por tal processo, fazendo com que a investigação desses fatores de transcrição seja necessária.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar sequências codificadoras de WRKYs em morango (*Fragaria* × *ananassa*) e caracterizar sua expressão transcricional em frutos de diferentes estádios de desenvolvimento e submetidos a estresses osmóticos.

Objetivos específicos

- Identificar *FaWRKYs* através de pesquisas em banco de dados e pela busca em bancos de mRNA-Seq *in house*.
- Aferir relação filogenéticas entre as *FaWRKYs* identificadas.
- Avaliar a expressão *in silico* de *FaWRKYs* em bancos de mRNA-Seq provenientes de frutos cultivados sob condições de estresse salino e hídrico.
- Avaliar a expressão por RT-qPCR de *FaWRKYs* em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento dos frutos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O morango

A espécie comercial de morango (*Fragaria* × *ananassa*) pertence à família das Rosaceae e tem como origem a hibridização de duas espécies de octoplóides, *Fragaria virginiana*, do leste da América do Norte, e *Fragaria chiloensis*, que é nativa do Alasca (KENERY et al., 2006). No Brasil, a cultura do morangueiro mostra-se presente e progressiva em diversas regiões; tal distribuição deve-se à fácil adaptação de cultivo, clima e a alta demanda pelo fruto. O morango é a espécie do grupo das pequenas frutas com maior expressão econômica e tradição de cultivo no país, onde apresenta produção superior a 70 mil toneladas, com destaque para os estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul (IBGE - www.ibge.gov.br). As cultivares mais plantadas no Brasil são 'Oso Grande' na região Sudeste e 'Camarosa', 'Aromas' e 'Albion' na região Sul (EMBRAPA, 2011).

O morango é um pseudofruto muito apreciado e consumido, especialmente devido ao seu sabor, aroma e seus conhecidos potenciais benefícios à saúde, proporcionados pela presença de compostos funcionais (SCHAART et al., 2013; GIAMPERI et al., 2012). Embora se trate de um pseudofruto, neste trabalho será denominado de fruto, pela popularização desta expressão. Este fruto é considerado fonte de fenilpropanoides, com destaque para os flavonóis, taninos hidrolisáveis, ácidos hidroxibenzóicos, ácido hidroxicinâmico e antocianinas. Este último representa o grupo de pigmentos mais importante nesta cultura, cuja presença auxilia na avaliação da maturidade do fruto. Todos esses compostos variam conforme fatores edafoclimáticos e genotípicos (PINELI et al., 2011). Também estão presentes na composição deste fruto alguns minerais (potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês, zinco e cobre) e vitamina C (GIAMPIERI et al., 2012).

Apesar da grande produção e dos avanços tecnológicos da cultura do morangueiro, alguns fatores ainda limitam a sua produtividade. Dentre esses fatores, destaca-se a alta sensibilidade aos déficits hídrico e nutricional, uma vez que por possuírem sistema radicular de pouca profundidade, área foliar

extensa e frutos com elevado conteúdo de água demandam quantidades consideráveis de água para seu cultivo (KLAMKOWSKI; TREDER, 2014).

Embora esta cultura exija grande demanda de nutrientes e água, o aumento populacional tem resultado no uso de terras não utilizadas anteriormente para a agricultura, por apresentar alto teor de salinidade, e na redução do uso de irrigação em vista da escassez de recursos hídricos que assola diversas regiões no mundo. Além disso, o estresse salino representa um problema considerável no cultivo do morangueiro, devido ao crescente uso de água de irrigação de baixa qualidade, apresentando altos índices de sais suspensos (GRANT et al., 2010). A salinidade é um dos principais estressores ambientais que afetam o desenvolvimento das plantas, pois tende a inibir o crescimento vegetal por efeito osmótico e restringir a disponibilidade de água (LIU et al., 2007).

3.2. Estresses abióticos

Estresses abióticos, como seca, salinidade, temperaturas extremas, toxicidade química e estresse oxidativo são graves ameaças à agricultura e resultam na deterioração do ambiente. Estresse abiótico é a causa primária da perda de safra em todo o mundo, reduzindo os rendimentos médios para grandes culturas em mais de 50% (WANG et al., 2003). Dentre os estresses abióticos, salinidade, radiação UV, alterações de temperatura e aporte hídrico são considerados os principais estressores ambientais que causam danos às culturas. Entretanto, o tempo de exposição e a intensidade do estresse definem as alterações que irão ocorrer nas plantas, que vão desde modificações no metabolismo, crescimento e desenvolvimento até a senescência (ATKINSON; URWIN, 2012; JOGAIAH; GOVIND; TRAN, 2013).

Para que as plantas conseguissem adaptar-se e, consequentemente, garantir sua sobrevivência frente a estas condições, estas desenvolveram complexos mecanismos para captar sinais externos e emitir respostas frente a estes estresses. Estes mecanismos iniciam com a percepção do estímulo, seguido da transdução do sinal e regulação da expressão gênica, que acarretam em alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (ZHU, 2017).

Cada fator abiótico é capaz de gerar uma resposta diferente na planta, dependendo do tecido ou órgão afetado. As plantas podem resistir a estas perturbações através de mecanismos que evitem seus efeitos. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são moléculas primárias de resposta a estresse, as quais podem causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (SEYBOLD et al., 2014). Para neutralizar o efeito destrutivo das espécies reativas, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como produção de metabólitos secundários (GILROY et al., 2016).

Hormônios também são reguladores importantes na resposta a estresses abióticos, sendo o ácido abscísico (ABA) o principal hormônio envolvido em resposta a estresses abióticos (YE; JIA; ZHANG, 2012). O ABA atua como sinalizador em resposta a estresses osmóticos (seca, salinidade), atuando principalmente no fechamento estomático (VISHWAKARMA et al., 2017).

Apesar dos estressores abióticos, como o déficit hídrico e o excesso salino, causarem prejuízos para o crescimento das plantas, condições de estresse moderadas podem ser impostas, para melhorar o acúmulo de compostos antioxidantes, além de estimular a planta a se adaptar a ambientes propensos ao estresse (GALLI et al., 2016; KIM et al., 2008). Isto ocorre porque estresses moderados induzem a produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa acarretando em um aumento da tolerância destas plantas a estresses subsequentes, uma vez que seu metabolismo já estaria direcionado à produção de metabólitos secundários, e ao mesmo tempo proporcionando a biofortificação do alimento gerado através do aumento no seu potencial antioxidante (MESSIAS et al., 2015).

3.3. Maturação de frutos

Os frutos carnosos fazem parte integrante da dieta humana, uma vez que são tidos como uma importante fonte de vitaminas, minerais, antioxidantes, açúcares e teor de fibras (CHERAN et al., 2014; BAPAT et al., 2015). Os atributos da qualidade nutricional dos frutos dependem em grande parte da

fase de maturação, o que é muito valorizado para o consumo (SYMONS et al., 2012).

Baseado no perfil da respiração e produção de etileno durante o amadurecimento, os frutos podem ser divididos em duas classes: climatério e não-climatério (CHEN et al., 2018). Em frutos climatéricos, o etileno é responsável por regular vários processos associados ao amadurecimento, incluindo amolecimento, mudança de cor, acúmulo de açúcar, produção de ácido orgânico, bem como o acúmulo de metabólitos secundários.

Os frutos do morangueiro são classificados como não climatéricos, devido ao fato de não apresentarem um pico de respiração e produção de etileno durante o processo de maturação, como ocorre com os frutos climatéricos (JIA et al., 2011). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam seu amadurecimento, ainda não estão completamente elucidados. Estudos mostraram que em frutos não climatéricos, o conteúdo de ABA aumenta durante a maturação (LI et al., 2011), sugerindo que este hormônio pode ser um possível candidato para o controle da maturação em frutos não-climatéricos.

Dentre os não-climatéricos, o morangueiro se destaca por produzir frutos rapidamente, pelo seu sistema de cultivo ser bem estabelecido e existirem informações genéticas disponíveis. Portanto, o morango apresenta-se como um bom modelo biológico para compreender os mecanismos envolvidos na maturação de frutos não-climatéricos bem como para entender as relações de estresse e produção de compostos de interesse.

3.4. Fatores de transcrição WRKY

Dentre as proteínas envolvidas na regulação gênica, os fatores de transcrição são de fundamental importância por se ligarem a regiões promotoras dos genes permitindo o reconhecimento e ligação de RNA polimerases para que a transcrição ocorra. A família WRKY está entre as dez maiores famílias de fatores de transcrição em plantas superiores (ULKER e SOMSSICH 2004). A família expandiu-se durante a evolução das plantas. Esta expansão provavelmente está associada com o desenvolvimento contínuo de mecanismos altamente sofisticados de defesa co-evoluindo em plantas

terrestres junto com seus patógenos adaptados (ULKER e SOMSSICH 2004). Os fatores de transcrição WRKY pertencem a uma grande família gênica presente em uma ampla gama de plantas e inclusive em algas (ZHANG E WANG, 2005). Os dois primeiros artigos a relatarem sua existência, as definiram como proteínas de ligação ao DNA que desempenhavam potencial papel na regulação da expressão gênica pela sacarose (SPF1) (ISHIGURO, S. e NAKAMURA, 1994; RUSHTON, 1996) ou durante a germinação (ABF1 e ABF2) (RUSHTON, 1995). Um terceiro relato identificou WRKY1, WRKY2 e WRKY3 de salsa (*Petroselinum crispum*) e cunhou o nome WRKY (pronuncia-se "Worky"). Este documento também forneceu a primeira evidência de que as proteínas WRKY desempenham papéis na regulação da resposta a patógenos, e muitos relatos desde então mostram que este é um papel importante dos fatores de transcrição WRKY. Em particular, os fatores WRKY são reguladores chave, positivos e negativos, da imunidade inata e adaptativa da planta (EULGEM, 2007).

As proteínas WRKY estão associadas a processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, síntese de metabólitos secundários, resposta a fatores bióticos e abióticos, através da auto-regulação e da regulação cruzada deles mesmos e de outros genes. A característica mais proeminente da família de WRKY é a presença de um ou dois domínios que consistem em aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos com uma sequência altamente conservada, “WRKYGQK”, na posição N-terminal da proteína (EULGEM et al., 2000), além de um motivo semelhante a um dedo de zinco no terminal carboxílico (RUSHTON et al., 2010).

De acordo com a presença dos domínios, as WRKYs são categorizadas em três grupos (RUSHTON et al., 2010; RINERSON et al., 2015). Grupo I, contém dois domínios WRKY; Grupo II apresenta um domínio WRKY e o motivo semelhante ao dedo de zinco C2 – H2 (C– X4−5 – C – X22−23 – H – X1 – H); e Grupo III contém um domínio WRKY e um motivo dedo de zinco C2 – HC (C – X7 – C – X23 – H – X1 – C) (EULGEM et al., 2000). Com base nas seqüências primárias de aminoácidos, o Grupo II pode ainda ser dividido em três subgrupos (ZHANG e WANG, 2005).

As proteínas WRKY ligam-se à porção W-box ((C/T)TGAC(T/C)) dos seus genes alvo (CIOLKOWSKI et al., 2008), bem como à porção SURE (*sugar*

responsive) que desempenha um papel na promoção da transcrição (SUN et al., 2003). Através da ligação do domínio WRKY ao elemento de ação cis da W-box (sequência consenso: (T) (T) TGAC (C / T)) nos promotores dos seus genes alvo, as WRKYs podem atuar como ativadoras ou repressoras transcricionais em cascatas reguladoras (RUSHTON et al., 2010; Yokotani et al., 2013; BAKSHI e OELMULLER, 2014). A especificidade funcional das WRKYs é definida por muitos fatores incluindo o W-box (YAN et al., 2013), o domínio WRKY (CHENG et al., 2015), interações com outras proteínas (BRAND et al., 2013; FRANCO-ZORRILLA et al., 2014) e modificações pós-traducionais (LAI et al., 2011).

3.5. O papel das proteínas WRKYs na resposta a estresses abióticos

Vários estudos demonstram que os fatores WRKYs estão envolvidos na resposta de plantas a estresses abióticos, como seca e salinidade (BAI, 2018). A exemplo disso, a expressão do gene *SlWRKY39* presente no tomate, homólogo ao gene *AtWRKY40* de *Arabidopsis thaliana*, aumentam sua expressão quando induzidos por condições de alta salinidade, seca, além de exposição a ABA, SA (ácido salicílico), JA (ácido jasmônico) e pela infecção com *Pseudomonas syringae* (HUANG et al., 2012; SUN et al., 2015); enquanto que o gene *SlWRKY45*, outro homólogo de *AtWRKY40*, foi regulado por tratamento a frio (CHEN et al., 2015).

Além disso, o gene *AtWRKY46* mostrou ser regulado durante estresse osmótico e em resposta à via de sinalização mediada por ABA e auxina (DING et al., 2015). De forma similar, a superexpressão dos genes *TaWRKY1* e *TaWRKY33* (genes de trigo que são homólogos de *AtWRKY40*) em Arabidopsis aumentou a tolerância à seca através de uma via dependente de ABA (HE et al., 2016).

Superexpressão de *TaWRKY10* e *TaWRKY44* em tabaco mostrou que esses genes atuam na tolerância à seca e ao estresse salino através da regulação do equilíbrio osmótico e da eliminação de ROS (Wang et al., 2013, 2015). De forma similar, a superexpressão do gene do crisântemo (*DgWRKY5*) aumentou a tolerância ao estresse salino, aumentando a eliminação de ROS e o ajuste osmótico (Liang et al., 2017). E a superexpressão do gene

GhWRKY41 de algodão (*Gossypium hirsutum*), em tabaco, resultou em tolerância à seca e ao sal através do fechamento estomático, bem como da regulação de ROS (Chu et al., 2015). A regulação do fechamento estomático em esposta à seca e ao estresse salino também parece ser dependente do gene *AtWRKY46* em Arabidopsis (Ding et al., 2015).

Em arroz, por sua vez, o envolvimento do gene *OsWRKY30* na tolerância à seca parece envolver a ativação da vida de MAPK (Rushton et al., 2010; Shen et al., 2012). Cabe salientar que *DgWRKY5*, *AtWRKY25*, *TaWRKY44* e *OsWRKY30* são todos membros da família WRKY Group I (Liang et al., 2017).

Na videira, o fator de transcrição *VvWRKY*8 seria responsável por regular a via biossintética de resveratrol (Res), um composto fenólico responsável por respostas a estresses bióticos e abióticos. A superexpressão transitória e estável de *VvWRKY8* na videira resultou na diminuição da expressão de *VvSTS15 / 21* e *VvMYB14*, responsáveis pela síntese de tal composto, bem como na redução do acúmulo de Res (JIANG et al., 2018). O fator VvWRKY8 não se liga nem ativa os promotores de *VvMYB14* e *VvSTS15 / 21*; ele na verdade atua interagindo fisicamente com a proteína VvMYB14, através dos seus domínios N-terminais, para impedir que VvMYB14 se ligue ao promotor dos genes *VvSTS15 / 21* (JIANG et al., 2018).

3.6. O papel das proteínas WRKYs durante o desenvolvimento da planta e no amadurecimento e senescência de frutos

Quanto ao desenvolvimento de plantas, *AtWRKY44*, foi o primeiro gene da família gênica das WRKYs cuja função foi inequivocadamente determinada, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento do tricoma (SMYTH et al., 2002). Plantas com mutações nesse gene apresentam tricomas não ramificados, além de reduções na produção e síntese de tanino no tegumento da semente. Fatores de transcrição WRKY mais provavelmente co-regulam outros processos como a senescência. Nas raízes, numerosos genes de WRKYs em Arabidopsis são expressos em um domínio localizado, sugerindo que eles têm um papel especializado na maturação celular (BENFEY et al., 2003).

Já o fator de transcrição *OsWRKY71*, presente em arroz, desempenha importante papel na sinalização hormonal, atuando como um repressor transcricional de genes de resposta à giberelina (ZANG et al., 2004). Em pimenta, a expressão de *CaWRKY1* apresenta forte regulação positiva e pode desempenhar um papel importante na maturação dos frutos (HARN, 2004).). Ainda, a abundância de '*Expressed sequence tags'* (ESTs) que codificam WRKYs presentes em bibliotecas de cDNA da plantas geradas a partir de material floral e embrionário poderia indicar que os fatores de transcrição WRKY têm funções nestes tecidos (HUANG et al., 2002). Além disso, em banana, o gene *MaWRKY119* apresentou uma alta expressão no caule e na folha da planta, enquanto o gene *MaWRKY83* foi expresso principalmente em folhas e casca não madura e estava ausente em polpa verde, sendo, portanto possivelmente relacionado ao desenvolvimento e amadurecimento do fruto (GOEL et al. 2016). Em *Fragaria vesca,* os genes *FvWRKY4, 46 e 48* pertencentes ao grupo IIc são altamente expressos em frutos durante o desenvolvimento dos mesmos, sugerindo um papel putativo na regulação do desenvolvimento e amadurecimento de frutos (ZHOU et al., 2016).

3.7. Análise de expressão gênica utilizando mRNA-Seq

O mRNA-Seq tem se mostrado uma ferramenta poderosa com uma infinidade de aplicações, de estudos detalhados de processos biológicos em nível de células específicas a informações relevantes de questões fundamentais na biologia vegetal em escala evolutiva, representando um recurso robusto para fornecer um grande número de sequências. Esta metodologia apresenta diversas vantagens, incluindo alto rendimento, baixo custo, alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e a não necessidade de um genoma como sequência de referência, uma vez que os dados gerados no mRNA-Seq podem por si só serem usados para criar sequências montadas para realizar o subsequente mapeamento de *reads*, permitindo a detecção de junções exon/exon, *splicing* alternativos, isoformas de genes, bem como de novas regiões transcritas em uma única corrida (COKUS et al., 2008; LISTER et al., 2008; FILICHKIN et al., 2011; MARTIN et al., 2013).

O mRNA-Seq tem ainda substituído outros métodos de quantificação de expressão de transcritos, incluindo plataformas de microarranjos baseados em cDNA e ESTs, uma vez que supera muitas de suas limitações. Por exemplo, a técnica de mRNA-Seq não está restrita a detectar apenas aqueles transcritos representados no microarranjo, e também apresenta limites superiores e inferiores de detecção maiores, o que permite a quantificação mais acurada de transcritos diferencialmente expressos, bem como a identificação de transcritos pouco abundantes (ALBA et al., 2004; TORRES et al., 2008; WANG et al., 2011).

3.8. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real - (RT-qPCR)

Polymerase chain reaction: PCR, do inglês para 'reação em cadeia da polimerase' é uma técnica de biologia molecular que permite a síntese e amplificação de fragmentos de DNA específicos obtidos a partir de uma fita nucleotídica molde. Através desta metodologia é possível amplificar bilhares de vezes uma sequência de DNA de interesse diretamente de um genoma, plasmídeo ou outra fonte de material genético (NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004; ALBERTS et al., 2010). O desenvolvimento do monitoramento da PCR quantitativa em tempo real (qPCR: *quantitative real-time* PCR) permitiu um enorme avanço no processo de quantificação de fragmentos de material genético (JAIN et al., 2006; ZHANG et al., 2009), suprindo demanda da pesquisa e possibilitando novas análises, principalmente a quantificação da expressão gênica (WANG et al., 2009; MANOLI et al., 2012).

Como mecanismo de acompanhamento, a PCR em tempo real utiliza moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos, chamadas de fluoróforos, para acompanhar as reações no decorrer dos ciclos. A detecção é medida através da quantidade de fluorescência emitida pelos fluoróforos incorporados ao produto recém-formado do processo de PCR. Além das sondas fluorogênicas, os agentes intercalantes capazes de encaixar entre os pares de base da molécula de DNA, são os tipos de molécula mais utilizadas na detecção da amplificação na PCR em tempo real (GACHON et al., 2004; NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004).

Para realização da técnica é necessário a utilização de um termociclador com sistema óptico capaz de captar a fluorescência emitida pela excitação do fluoróforo acoplado a amostra. O sistema deve estar conectado a um computador com *software* específico para aquisição dos dados e análise dos resultados das reações (NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004).

O SYBR® Green é um agente intercalante amplamente utilizado em qPCR como indicador de amplificação. Durante a etapa de polimerização da PCR promovida pela enzima Taq DNA polimerase as moléculas deste agente se ligam as duplas fitas de DNA recém-sintetizadas. O sistema óptico do termociclador excita as moléculas do SYBR® Green com a emissão de um feixe luminoso que provoca a emissão de fluorescência verde com a ligação da molécula do agente com a fita dupla de DNA. A detecção da fluorescência ao final de cada etapa de extensão das fitas de DNA em cada ciclo da PCR, em tempo real, contínua e proporcionalmente, permite monitorar e estimar o total de DNA amplificado (GACHON et al., 2004; NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004; ARYA et al., 2005). Na etapa seguinte do ciclo, ocorre a desnaturação do DNA, liberando as moléculas de SYBR® Green, promovendo queda na quantidade de fluorescência emitida.

Dentre as vantagens na utilização do SYBR® Green, destacam-se o baixo custo com sua facilidade de uso e sensibilidade, porém, por ser um agente intercalante que se insere a qualquer dupla fita de DNA presente na amostra durante o processo de PCR, o mesmo se insere em dímeros de *primers* que se formem durante os ciclos, bem como quaisquer outros produtos inespecíficos da síntese de DNA, elevando a taxa de fluorescência e levando a medição superestimada da concentração do fragmento de interesse amplificado na amostra (GACHON et al., 2004; NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004).

Como alternativa ao SYBR® Green existem as sondas de hidrólise que são constituídas de fragmentos de DNA marcados, sendo complementares e específicos aos amplicons de interesse sintetizados durante a PCR, assim, aumentando sua especificidade e possibilitando detecções mais precisas (GACHON et al., 2004; NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004). Dentre as sondas de hidrólise mais comuns utilizadas, destacam-se TaqMan® e Molecular Beacons (BUSTIN et al., 2009).

Na quantificação da expressão gênica por qPCR, é necessário fazer a normalização dos dados obtidos, adicionando às análises genes endógenos de referência, ou genes normalizadores, para assim garantir que se discriminem os valores gerados pela análise, diferenciando aquilo que destoa da expressão comum desses genes. Genes normalizadores são aqueles estabelecidos por possuir expressão regular em determinando tecido em estudo, tendo expressão invariável quando submetido a diferentes tratamentos, garantindo resultados reproduzíveis e mais precisos (BUSTIN et al., 2009). Actina, ubiquitina e tubulina tem sido amplamente utlilizados como genes referência para normalização dos dados de expressão gênica (WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Com a PCR em tempo real não se faz necessária a utilização de metodologias de quantificação como o gel de eletroforese, comum na PCR clássica. Todo o processo de reação é realizado com as placas de PCR seladas, de maneira a reduzir o risco de contaminação e evaporação das amostras. A reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade são elevadas, principalmente devido a coleta e quantificação dos dados durante a fase exponencial de amplificação da PCR e não apenas ao final dos ciclos (GACHON et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Identificação dos genes WRKY em *Fragaria x ananassa*

Para realizar a busca por *WRKYs* em *Fragaria x ananassa* foram utilizados bancos de mRNA-Seq depositados no Genome Database for Rosaceae (GDR) (https://www.rosaceae.org/), e bancos de m*RNA*-Seq *in house*. Como iscas, foram utilizadas sequencias *WRKYs* de *Fragaria vesca* disponíveis no banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

A busca por sequências homólogas nos bancos de mRNA-Seq foi realizada utilizando sequencias não redundantes do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), e do banco de dados do Swiss-prot (http://www.expasy.ch/sprot/), aplicando o programa BLASTX (e-value<$1e^{-6}$). As sequencias putativas foram traduzidas em peptídeos a partir do maior 'open reading frame' (fase aberta de leitura) utilizando a ferramenta ORFFinder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html).

Posteriormente, a presença de um ou dois domínios característicos da família gênica das WRKY foi verificada utilizando a ferramentas on-line PROSITE (http://prosite.expasy.org/), objetivando a confirmação de cada sequência putativa.

4.2. Predição de exons e introns

O genoma de *F. ananassa* na forma de *scaffolds* foi baixado e utilizado, juntamente com os cDNA de cada um dos genes para avaliar o padrão de distribuição de exons e introns. Essa distribuição foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/).

4.3. Análise filogenética

As sequências aminoacídicas putativas identificadas em *Fragaria x ananassa* (*Fa*WRKY), juntamente com sequências WRKY previamente descritas em *Fragaria vesca* (FvWRKY) foram utilizados para construir a árvore filogenética. A classificação em diferentes grupos foi realizada segundo o esquema de classificação de domínios e motivos presentes em *WRKYs* de *Arabidopsis thaliana* (*AtWRKY*), de acordo com Eulgem et al. (2000). O

alinhamento das sequencias identificadas e das sequencias *FvWRKY* previamente descritas foi realizado na ferramenta Clustal X 2.147, utilizando as configurações padrão. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA6, utilizando o método de agrupamento *Neighbor Joining*, com valores de *bootstrap* de 1000 (TAMURA et al., 2007).

Com base na comparação dos domínios identificados, relações evolutivas entre as sequências foram aferidas através da ferramenta MEME (http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html).

4.4. Análise de expressão in silico utilizando bancos de mRNA-Seq

A expressão in silico foi realizada com três bancos de mRNA-Seq: controle - obtidos a partir de frutos de morango maduros sem tratamento; estresse salino – obtido a partir de frutos maduros de morango cultivados sob condições de estresse salino (NaCl); e estresse hídrico – obtido a partir de frutos maduros de morango cultivados sob condições de restrição hídrica. Estes bancos estão depositados no GEO (Gene Expression Omnibus), sob o número SRA: SRP082122, e a metodologia utilizada para sua obtenção está descrita em Galli et al. (2018). Para isso, o software Bowtie (version 0.12.7) (Langmead et al. 2009) foi utilizado para mapear os *reads* de cada um dos três bancos às sequências de *FaWRKY* preditas. Posteriormente, os *reads* foram contados usando a ferramenta SAMtools (version 0.1.16). O método de normalização de escala proposto por Robinson e Oshlack (2010) foi utilizado para a normalização dos dados. O resultado foi apresentado utilizando um mapa de calor (*heat map*), o qual foi construído utilizando a ferramenta MeV (mev.tm4.org)

4.5. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

4.5.1 Obtenção das amostras biológicas

Para avaliar a expressão dos genes *FaWRKY* durante o desenvolvimento dos frutos de morango, foram coletadas amostras de um cultivo a campo, referente a seis diferentes estádios de maturação (7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese), além de amostras de raízes e folhas. Após a

coleta, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio liquido e armazenados a -80°C até o momento das análises.

O delineamento experimental das amostras foi inteiramente aleatório, contando com três réplicas de cada estádio de desenvolvimento:

- **Estádio 1 (7 dias após antese):**
  → E1R1, E1R2 e E1R3
- **Estádio 2 (14 dias após antese):**
  → E2R1, E2R2 e E2R3
- **Estádio 3 (18 dias após antese):**
  → E3R1, E3R2 e E3R3
- **Estádio 4 (21 dias após antese):**
  → E4R1, E4R2 e E4R3
- **Estádio 5 (24 dias após antese):**
  → E5R1, E5R2 eE5R3
- **Estádio 6 (28 dias após antese):**
  → E6R1, E6R2 e E6R3

Quanto as amostras de raízes e folhas, foram casualmente escolhidas três réplicas de cada um dos tecidos:

- **Amostras de raízes:**
  → R1R1, R1R2 e R1R3
- **Amostras de folhas:**
  → F1R1, F1R2 e R1R3

4.1.1 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

O isolamento de RNA foi feito pelo método CTAB de extração (MESSIAS et al., 2014). Posteriormente foi feita quantificação através do NanoVue®. O RNA total foi tratado com 1µL de DNAse e 1µL de tampão de reação DNAse I e posteriormente reversamente transcrito usando a enzima M-MLV e *primers* oligo-dT, todo o processo realizado conforme instruções do fabricante (Invitrogen™).

4.1.2 Desenho dos *primers*

As nove sequências de *FaWRKY* que apresentaram maior número de *reads* de acordo com a análise de expressão in silico foram selecionados para

o desenho de *primers* para realização de PCR e PCR em Tempo Real. Os *primers* foram desenhados através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen® de modo que os *amplicons* não fossem superiores a 200 pares de base, tendo em vista que resultados satisfatórios em RT-qPCR são obtidos com fragmentos amplificados com 100-250 pares de base. A temperatura de *melting* (Tm) foi mantida entre 52º- 58º e o conteúdo de GC de 45-55%. As sequências desenhadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de *primers* gerados a partir das sequências selecionadas de WRKYs em morango.

Nome	*Contig*	Primer foward	Primer reverse
FaWRKY10	CL2766_contig1	GGCTCATCAGAAG ACAGTGGTG	GTGGAGAGAAGCA AAACTGATG
FaWRKY18	CL3297_contig3	GTACCACCAACTAC GGCGG	GCACACTTGGGCTT TCTCG
FaWRKY20	CL3488Contig2	CTTGCTGGAGCTAT GGGGTC	GCAGGCGAGTTAA GCAACCC
FaWRKY37	CL6586_contig1	ACATTAAGGAGGC AGAGCGGG	TTTCTTCCCAGGCA GAGACCCC
FaWRKY45	CL8668_contig1	CTTTGACCAGGAC CGAACCG	CAACAAGGAGCGG AGAAGGA
FaWRKY47	Cl11308_contig1	CTGAGTGAGGTTG ACATCTTGG	GACACTTCGGGAC CAACAAC
FaWRKY51	CL15370_contig1	ATGGAGGAGGTTG AAGCAGC	AGCCTCTTCTTGGA TCGCCC
FaWRKY52	CL15580_contig1	GTCTGGGGGTGCT GAAGATAGC	GGTCAGAAGATGG CTAAAGGG
FaWRKY57	CL2718Contig1	CGAACCCACAAAC CCAATAACC	CTTCCATCTCCAAC TACTGGGA

4.1.3 Amplificação dos genes *FaWRKY* por PCR

A fim de verificar a funcionalidade dos *primers* projetados, uma PCR foi realizada utilizando a amostra de cDNA E6R1 (Estadio 6: 28 dias após antese). A reação foi realizada com volume final de 13,5 µL, onde: 2,0 µL do cDNA, 6,25 µL de mix GoTaq (InvitrogenTM), 1,0 µL de cada *primer* e 3,25 µL de água. A reação foi realizada em termociclador com a seguinte programação de temperatura e tempo: 95° C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min, com extensão final a 72 °C por 7 min. O resultado das amplificações foi avaliado em gel de agarose 1,2 %, através de uma corrida de eletroforese a 100v e 400a, por 40 minutos.

4.1.4 Reações de PCR em tempo real

Para realização do RT-qPCR, o cDNA foi diluído até concentração de 10 ng/mL^{-1} e amplificado em um volume final de reação de 20 µL, onde: 1 µL do cDNA, 0,05 µL de Taq Platinum (Invitrogen™), 2 µL de Tampão, 2 µL de $MgCl_2$, 0,2 µL de dNTP, 3 µL de SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen™) e 0,5 µL de cada *primer*, somado a água, fecharam a reação. A análise foi realizada em placas de 96 poços, utilizando um Termociclador Bio-rad CFX Real Time, com os seguintes parâmetros de amplificação: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95 °C, com incremento de 5 °C a cada medida de fluorescência.

O gene de referência utilizado foi o DBP (DNA Binding Protein) usado para normalizar os níveis de transcrição, conforme proposto por Galli et al. (2015). Os dados da expressão relativa foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e são apresentados como expressão relativa. A análise foi realizada para três repetições biológicas e duas replicatas analíticas.

5 RESULTADOS

5.1. Identificação e caracterização de *Fa*WRKYs

Para identificar membros da família WRKY em morango (*F. ananassa*), métodos de bioinformática foram utilizados para coletar informações sobre esta família. Neste estudo, uma análise genômica da família *Fa*WRKY foi realizada com a ajuda de informações do *Genome Database for Rosaceae* (GDR) e de um bancos de mRNA-Seq *in house.* Para verificar a confiabilidade das sequências candidatas, verificou-se a presença dos domínios típicos de WRKYs, utilizando a ferramentas PROSITE.

Após a pesca de sequencias putativas de *FaWRKY* e da verificação da presença de domínios característicos, identificou-se um total de 64 genes pertencentes à família gênica *WRKY*, presentes em morango (*Fragaria x ananassa*). A maior ORF foi identificada pela ferramenta de bioinformática ORF FINDER, conforme a tabela 2, sendo que 29 destas ORFs apresentam direção senso (+) e 35 antissenso (-). A proteína *Fa*WRKY57 apresentou maior número de aminoácidos (626 aa), enquanto que a *Fa*WRKY23 foi a proteína que apresentou o menor tamanho (81 aa).

Segundo EUGELM (2000), um total de 61 ORFs distintas potencialmente codificadoras de proteínas WRKY foram encontradas nos bancos de dados referente a *Arabidopsis thaliana.* Em *Fragaria vesca,* espécie mais próxima à *Fragaria x ananassa*, um total de 62 cópias foram identificadas de genes que codificam para WRKYs (WEI et al, 2016), número menor em relação ao encontrado nesse estudo (64 cópias), descoberta essa já esperada, uma vez que a *F. ananassa* se trata de uma espécie octaplóide, enquanto a *F. vesca* é diplóide. Outras cópias além das identificadas no presente estudo podem existir de modo que sua identificação poderia ser realizada por meio de diferentes estratégias de ferramentas *in silico* e bancos de dados provenientes de outros tecidos de morango que permitiriam a identificação de outras cópias que aqui não foram relatadas.

Tabela 2. Informações sobre as sequências de *WRKYs* identificadas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Orf	Strand	Frame	Start	Stop	Lenght (nt)	Lenght (aa)	Domínios
FaWRKY1	CL15Contig23	orf15	-	3	2146	1457	690	229	1
FaWRKY2	CL15Contig37	orf10	+	3	1083	2189	1107	368	1
FaWRKY3	CL589Contig1	orf5	-	3	1112	381	732	243	1
FaWRKY4	CL1351Contig1	orf1	+	2	14	928	915	304	1
FaWRKY5	CL1351Contig2	orf3	+	2	14	772	759	252	1
FaWRKY6	CL1351Contig5	orf1	+	1	4	933	930	309	1
FaWRKY7	CL1351Contig6	orf2	+	3	321	935	615	204	1
FaWRKY8	CL2754Contig3	orf11	-	2	2020	302	1719	572	1
FaWRKY9	CL2754Contig4	orf11	-	2	2081	399	1683	560	1
FaWRKY10	CL2766Contig1	orf1	+	1	274	1128	855	284	1
FaWRKY11	CL2905Contig1	orf10	-	3	1787	375	1413	470	2
FaWRKY12	CL2905Contig2	orf7	-	2	1739	381	1359	452	2
FaWRKY13	CL3045Contig2	orf7	-	3	1064	111	954	317	1
FaWRKY14	CL3045Contig3	orf5	-	1	1355	402	954	317	1
FaWRKY15	CL3122Contig3	orf8	-	3	1305	325	981	326	1
FaWRKY16	CL3122Contig4	orf5	-	1	1434	781	654	217	1
FaWRKY17	CL3297Contig1	orf9	-	3	1177	536	642	213	1
FaWRKY18	CL3297Contig3	orf2	+	2	287	757	471	156	1
FaWRKY19	CL3297Contig4	orf1	+	2	287	934	648	215	1
FaWRKY20	CL3488Contig2	orf5	+	3	189	1748	1560	519	2
FaWRKY21	CL3649Contig1	orf3	+	3	6	959	954	317	1
FaWRKY22	CL3649Contig2	orf7	-	3	1440	463	978	325	1
FaWRKY23	CL3649Contig3	orf3	-	1	709	464	246	81	1
FaWRKY24	CL3649Contig4	orf3	+	3	6	977	972	323	1
FaWRKY25	CL3649Contig5	orf1	+	2	113	889	777	258	1
FaWRKY26	CL4104Contig1	orf8	-	2	1596	937	660	219	1
FaWRKY27	CL4104Contig2	orf13	-	3	910	341	570	189	1
FaWRKY28	CL4104Contig3	orf7	-	2	1477	341	1137	378	1
FaWRKY29	CL5306Contig1	orf6	-	3	993	172	822	273	1
FaWRKY30	CL5306Contig2	orf6	-	1	993	172	822	273	1
FaWRKY31	CL5306Contig3	orf1	+	1	91	921	831	276	1
FaWRKY32	CL5306Contig4	orf1	+	1	148	978	831	276	1
FaWRKY33	CL5624Contig1	orf7	-	3	1724	780	945	314	1
FaWRKY34	CL5624Contig2	orf5	-	1	1697	756	942	313	1
FaWRKY35	CL6173Contig1	orf1	+	3	33	884	852	283	1
FaWRKY36	CL6173Contig2	orf2	+	3	33	941	909	302	1
FaWRKY37	CL6586Contig1	orf16	-	3	1947	511	1437	478	2
FaWRKY38	CL6852Contig1	orf12	-	2	1106	552	555	184	1
FaWRKY39	CL6852Contig2	orf3	+	2	500	1543	1044	347	1
FaWRKY40	CL7041Contig1	orf4	+	3	60	1079	1020	339	1
FaWRKY41	CL8092Contig1	orf12	-	2	1365	286	1080	359	1
FaWRKY42	CL8105Contig1	orf1	+	1	49	1059	1011	336	1
FaWRKY43	CL8227Contig1	orf2	+	2	188	1249	1062	353	1
FaWRKY44	CL8376Contig1	orf3	+	2	71	1075	1005	334	1

Tabela 2 (continuação). Informações sobre as sequências de *WRKYs* identificadas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Orf	Strand	Frame	Start	Stop	Lenght (nt)	Lenght (aa)	Domínios
FaWRKY45	CL8668Contig1	orf2	+	2	35	1552	1518	505	2
FaWRKY46	CL9443Contig1	orf6	+	3	45	989	945	315	1
FaWRKY47	CL11308Contig1	orf15	-	3	2020	305	1716	571	2
FaWRKY48	CL11794Contig1	orf2	+	2	215	979	765	254	1
FaWRKY49	CL13152Contig1	orf6	-	1	1137	184	954	317	1
FaWRKY50	CL15072Contig1	orf3	+	2	218	1369	1152	383	1
FaWRKY51	CL15370Contig1	orf11	-	3	1120	152	969	322	1
FaWRKY52	CL15580Contig1	orf1	+	1	127	1770	1644	547	1
FaWRKY53	CL26081Contig1	orf12	-	1	1043	285	759	252	1
FaWRKY54	lcl|ORF14 CDS CL309Contig2	orf14	-	3	1217	390	828	275	1
FaWRKY55	lcl|ORF9 CDS CL1918Contig2	orf9	-	1	1874	483	1392	463	2 e 1 receptor _TYR_KIN_II
FaWRKY56	lcl|ORF10 CDS CL1918Contig4	orf10	-	1	1893	424	1470	489	2 e 1 receptor _TYR_KIN_II
FaWRKY57	CL2718Contig1	orf2	+	2	86	1966	1881	626	2
FaWRKY58	CL2754Contig1	orf3	+	2	215	1936	1722	573	1
FaWRKY59	CL2754Contig2	orf10	-	1	1990	302	1689	562	1
FaWRKY60	CL2754Contig5	orf1	+	1	145	1863	1719	572	1
FaWRKY61	CL10605Contig1	orf2	-	1	677	243	435	144	1
FaWRKY62	lcl|ORF17 CDS Locus_5168	orf17	-	3	1891	422	1470	489	2 e 1 receptor _TYR_KIN_II
FaWRKY63	lcl_ORF9_CDS Locus_5598	orf9	-	2	1874	483	1392	463	2 e 1 receptor _TYR_KIN_II
FaWRKY64	lcl|ORF3_CDS Locus_12707	orf3	-	1	688	>2	687	228	1

A ferramenta online Prosite foi utilizada como modo de aferir a presença de domínios conservados nas sequências candidatas a pertencerem a família das *Fa*WRKYs. Segundo KUDLA et al. (2010), divergências estruturais entre as proteínas WRKYs, como a presença e posição dos domínios, podem indicar a história evolutiva dentro da família gênica. Desta forma, 64 genes *Fa*WRKYs foram confirmados quanto a presença de motivos, sendo identificados seis grupos conservados quanto à presença e posição (Figura 4). Sendo que 53 dessas sequências apresentam apenas um domínio característico, sete apresentam dois domínios e quatro apresentam dois domínios mais um receptor treonina quinase do tipo II. Quanto aos 6 motivos conservados existentes em WRKYs, as *Fa*WRKYs apresentaram entre um a cinco desses motivos, sendo que quatro *Fa*WRKYs apresentaram dois *motifs 3.* Tais fatos sugerem que houveram eventos de duplicação e deleção a partir da sequencia ancestral que caracterizaram mudanças inclusive nos domínios.

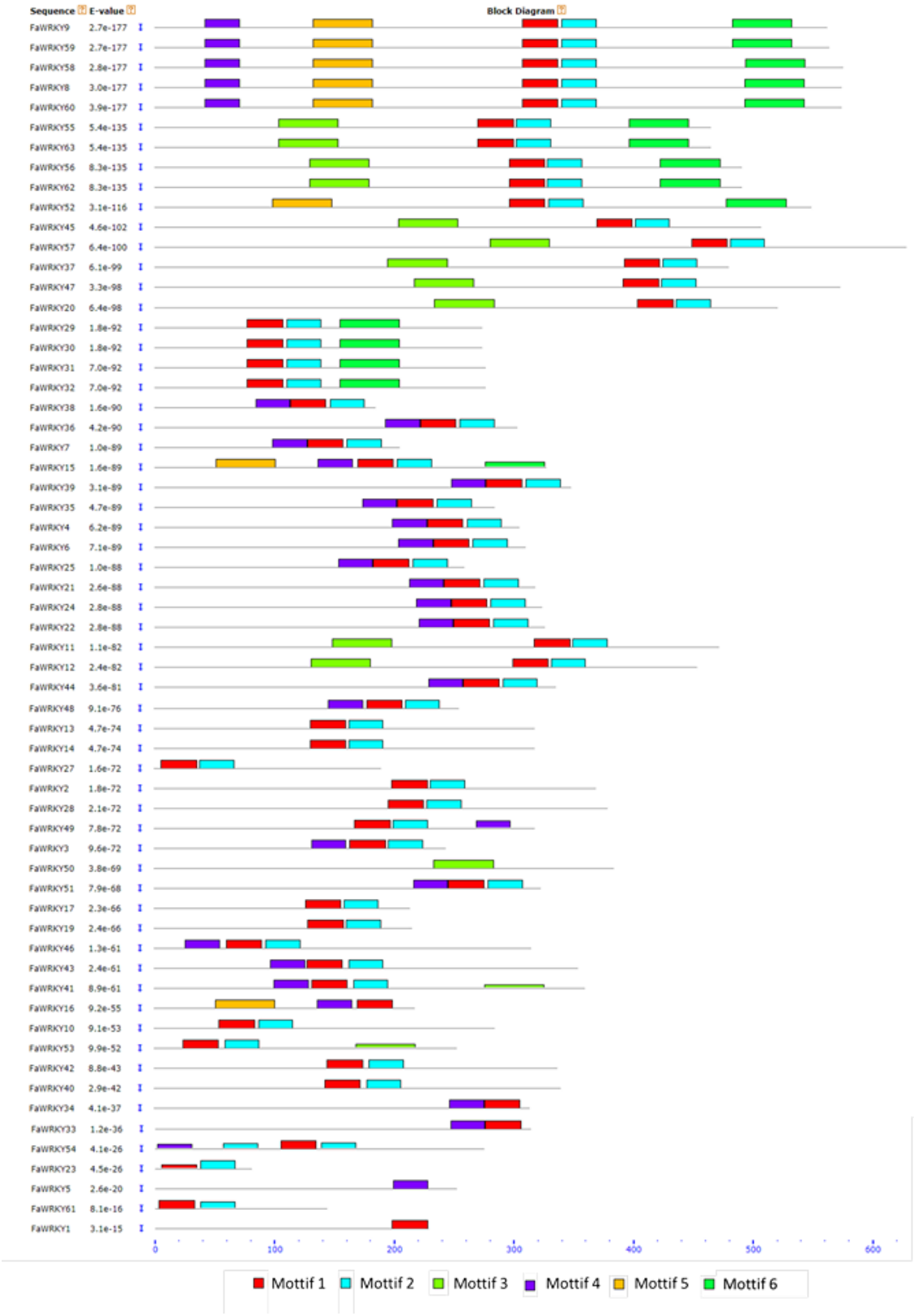

Figura 1. Organização dos diferentes padrões (porções/regiões) em 64 genes da família gênica das WRKYs presentes em *F. ananassa*. Os motifs conservados foram detectados usando as ferramentas on-line MEME (http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html).

A organização dos éxons/íntrons e o número de íntrons presentes também podem indicar a história evolutiva dentro de uma família gênica (BOUDET et al., 2001). Por isso, as estruturas gênicas das 64 *FaWRKYs* foram avaliadas para obter mais informações. A análise revelou que quatro *FaWRKYs* apresentam um íntron (*Fa*WRKY 1, 33, 34 e 53); onze apresentam dois íntrons (*Fa*WRKY 10, 22, 24, 25, 3, 38, 39, 41, 46, 49 e 50); nove apresentam três íntrons (*Fa*WRKY 16, 20, 21, 48, 54, 55, 56, 62 e 63); cinco apresentam quatro íntrons (*Fa*WRKY 11, 12, 15, 37 e 45); cinco apresentam cinco íntrons (*Fa*WRKY 47, 52, 58, 60 e 8) e; dois apresentam seis íntrons (*Fa*WRKY 59, 9).

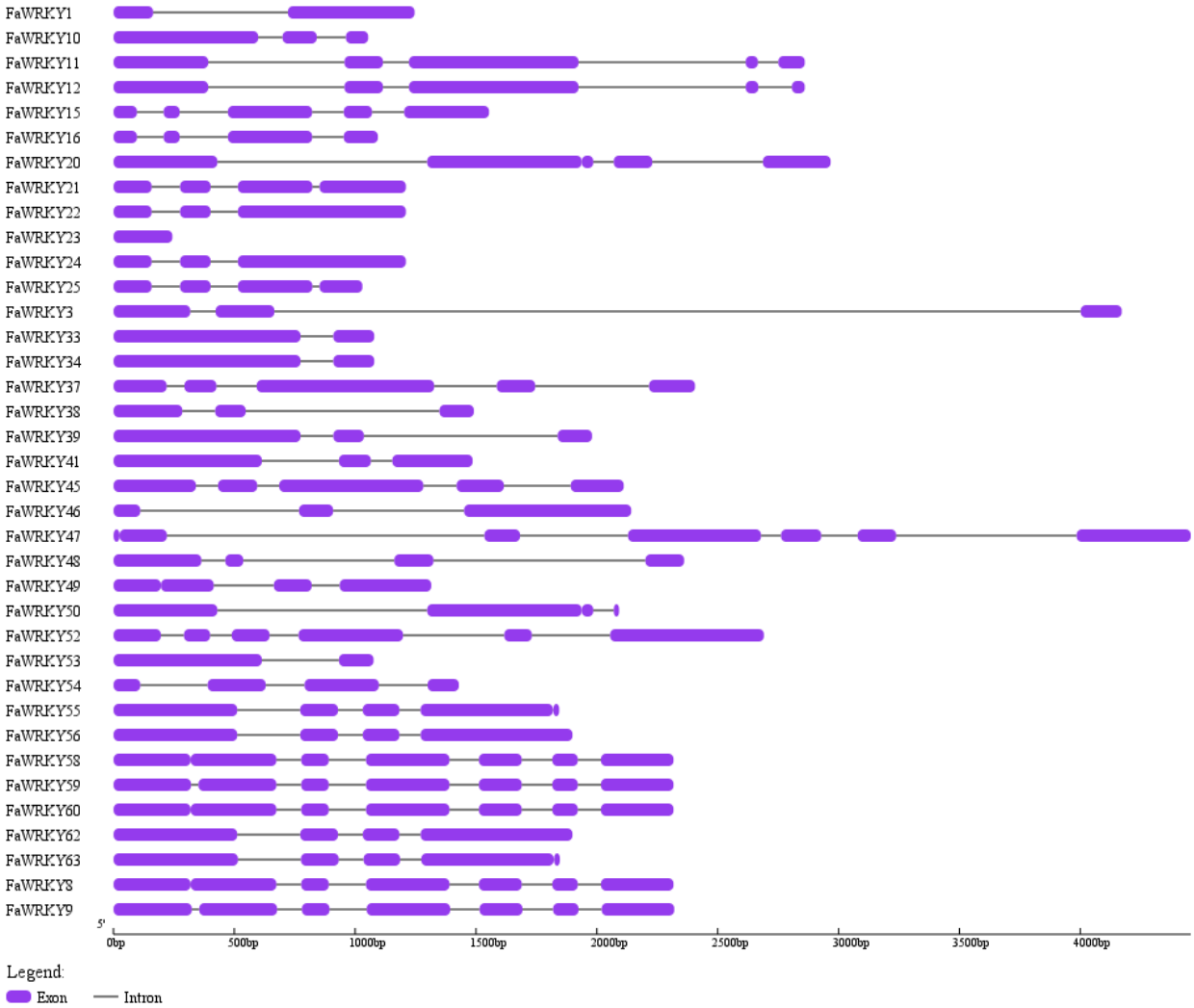

Figura 2. Estrutura dos éxons-íntrons dos 64 genes da família gênica das WRKYs presentes em *F. ananassa*. Éxons e íntrons são indicados por caixas roxas e linhas pretas, respectivamente.

Ainda assim, a predição de domínios, bem como a organização de éxons e íntrons não são o bastante para que se possa aferir uma análise

evolutiva adequada; para tanto, construiu-se uma árvore filogenética (Figura 6), utilizando a sequência aminoacídica traduzida pelos genes de *Fragaria vesca* (*FvWRKY)* e *Fragaria x ananassa* (*FaWRKY)*, onde pode-se observar a formação de três grupos (I, II e III), com cinco subgrupos no grupo II (IIa, IIb, IIc, IId e IIe). Desta forma, 17 *Fv*WRKYs e 17 *Fa*WRKYs pertencem ao grupo I; três *Fv*WRKYs e três *Fa*WRKYs ao subgrupo IIa; 15 *Fv*WRKYs e 11 *Fa*WRKYs ao subgrupo IIb; nove *Fv*WRKYs e 10 *Fa*WRKYs ao subgrupo IIc; seis *Fv*WRKYs e seis *Fa*WRKYs ao subgrupo IId; quatro *Fv*WRKYs e seis *Fa*WRKYs ao subgrupo IIe; e seis *Fv*WRKYs e sete *Fa*WRKYs ao grupo III.

Wei (2016) sugere que várias cópias de *FvWRKY* estão envolvidas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Em condições de déficit hídrico, 29 cópias *FvWRKY* aumentaram a expressão comparados ao tratamento controle, sendo que *FvWRKY23* foi a cópia com maior nível de expressão neste tratamento. *FaWRKY23* possui alta similaridade com esta cópia, sugerindo que em *Fragaria x ananassa* essa cópia também possa desempenhar importante papel na tolerância ao estresse hídrico.

Wei (2016) aponta ainda que cópias da família gênica das WRKYs presentes em *Fragaria vesca* estão relacionadas a proteínas VQ (MKS1, SIB1 e SIB2) que são envolvidas na regulação da resposta de defesa das plantas; MPK3 e MPK4, envolvido em respostas de plantas a patógenos e condições de estresse; STZ, envolvidos em respostas de estresse abiótico. O que sugere que *FaWRKYs* possam desempenhar papéis versáteis na resposta a estresses.

No grupo IIc estão presentes *Fa*WRKY19, *Fa*WRKY22 e *Fa*WRKY49, juntamente com *Fv*WRKY 46 e 48. Em *Fragaria x vesca*, *Fv*WRKY 46 e 48 apresentaram aumento na expressão durante o desenvolvimento do fruto, e com isso foi atribuído a essas cópias um papel provável na regulação do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos (Zhou, 2016), sugerindo que em *Fragaria x ananassa* as cópias *Fa*WRKY19, *Fa*WRKY22 e *Fa*WRKY49 possam ter importantes papeis nesses processos.

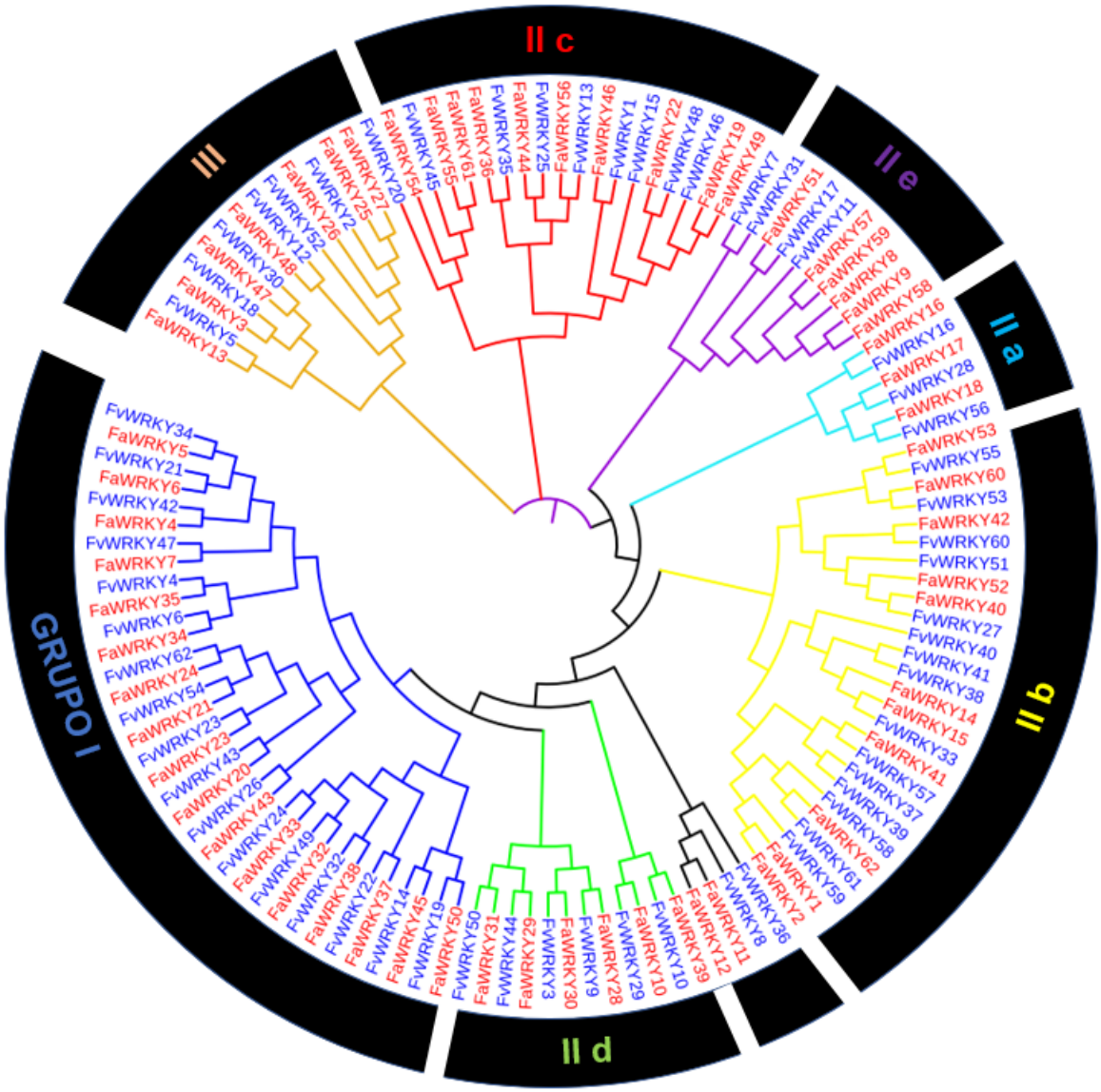

Figura 3. Análise filogenética de genes *WRKY* de morango. As sequências completas de aminoácidos traduzidas pelos genes *WRKY* em *Fragaria x ananassa.* (Fa - vermelho) e *F. vesca* (Fv - azul) foram alinhados usando ClustalX, e a árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap,* utilizando a ferramenta *Mega*. Os ramos da árvore foram coloridas para indicar os diferentes subgrupos formados.

5.2. Análise da expressão gênica de *FaWRKYs*

As WRKYs vem sendo relatadas como fatores essenciais na regulação da tolerância das plantas frente a situações de estresses bióticos e abióticos. Neste estudo, foi realizado o perfil de expressão gênica in silico das *FaWRKYs* em resposta a estresses por déficit hídrico e salinidade (Figura 7). Os

resultados mostram que a expressão de 50 *FaWRKYs* foi alterada em função dos tratamento, além disso, foram observados cinco grupos de comportamento: o grupo 1, formado por 6 genes que se mostraram *upregulated* em estresse hídrico e *downregulated* ou sem expressão diferencial para estresse salino; o grupo 2 formado por 18 genes que se mostram *downregulated* tanto em estresse hídrico como salino, ou sem expressão diferencial em um deles; o grupo 3, formado por 20 genes que se mostraram *upregulated* para estresse salino e *downregulated* ou sem expressão diferencial estresse hídrico e, por isso, possivelmente estão associados com resposta à toxicidade ao NaCl; o grupo 4, formado por 7 genes que se mostraram *upregulated* em ambos os estresses comparados ao controle, indicando estarem associados à resposta osmótica oriunda de ambos estresses e; o grupo 5, composto por 12 genes que não apresentaram expressão diferencial em nenhuma das duas condições.

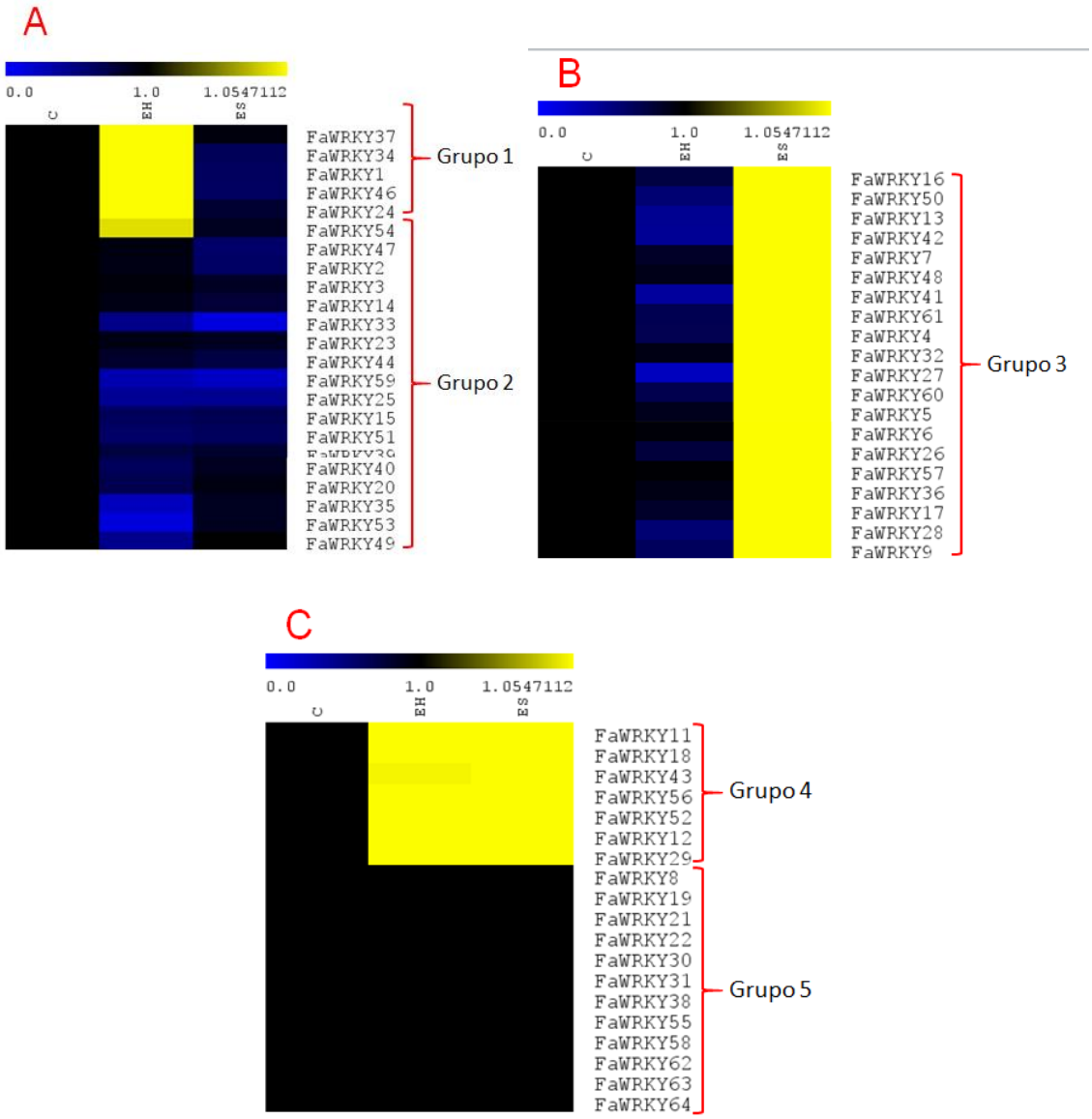

Figura 4. Mapa de cor (Heat map) mostrando a expressão de fatores de transcrição do tipo WRKY em frutos submetidos a condições de estresse osmótico. Sendo C - controle, EH - estresse hídrico e ES – estresse salino.

De acordo com o número de *reads*, conforme Tabela 3, foram selecionados os *contigs* que apresentaram número de *reads* igual ou superior a 100, o que sugere que os mesmos seriam genes mais expressos no fruto maduro, podendo apresentar um papel importante no processo de maturação. Essa etapa foi realizada para a escolha das sequencias a serem utilizadas para a síntese dos *primers* e avaliação da expressão por RT-qPCR, considerando que esta técnica apresenta menor sensibilidade do que o mRNA-Seq. Assim, como forma de elucidar os papéis regulatórios das *FaWRKYs* em diferentes

tecidos e durante o desenvolvimento dos frutos de morango, foi realizada uma RT-qPCR de raízes, folhas e diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos (7, 14, 18, 21, 24 e 28 dias pós-antese). Para tanto, foi realizado o isolamento de RNA destas amostras. O RNA obtido foi avaliado quanto à quantidade e qualidade através de leitura espectrofotométrica, como apresenta a Tabela 4. Os resultados mostram que as amostras apresentaram concentração de 76 a 255 ng/ µL, com razão A_{260}/A_{280} de 1,33 a 2,04. Embora tal leitura mostre que as concentrações das amostras de RNA tenham sido baixas, a maioria delas apresenta qualidade adequada ao considerar a razão A_{260}/A_{280} que indica que não há contaminação com proteínas.

Tabela 3. Contagem de *reads* nas sequencias putativas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Reads		
		C	EH	ES
FaWRKY1	CL15Contig23	75	58	103
FaWRKY2	CL15Contig37	21	21	30
FaWRKY3	CL589Contig1	84	80	86
FaWRKY4	CL1351Contig1	48	64	23
FaWRKY5	CL1351Contig2	30	31	17
FaWRKY6	CL1351Contig5	22	21	6
FaWRKY7	CL1351Contig6	41	45	30
FaWRKY8	CL2754Contig3	0	0	0
FaWRKY9	CL2754Contig4	14	20	3
FaWRKY10	CL2766Contig1	106	166	126
FaWRKY11	CL2905Contig1	31	23	19
FaWRKY12	CL2905Contig2	21	17	6
FaWRKY13	CL3045Contig2	9	19	5
FaWRKY14	CL3045Contig3	8	8	9
FaWRKY15	CL3122Contig3	21	30	27
FaWRKY16	CL3122Contig4	8	10	6
FaWRKY17	CL3297Contig1	27	30	8
FaWRKY18	CL3297Contig3	0	0	0
FaWRKY19	CL3297Contig4	0	0	0
FaWRKY20	CL3488Contig2	88	115	82
FaWRKY21	CL3649Contig1	11	12	18
FaWRKY22	CL3649Contig2	0	0	0
FaWRKY23	CL3649Contig3	3	3	3

Tabela 3 (Continuação). Contagem de *reads* nas sequencias putativas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Reads		
		C	EH	ES
FaWRKY24	CL3649Contig4	13	11	14
FaWRKY25	CL3649Contig5	5	11	10
FaWRKY26	CL4104Contig1	15	18	1
FaWRKY27	CL4104Contig2	4	15	1
FaWRKY28	CL4104Contig3	12	20	2
FaWRKY29	CL5306Contig1	6	3	0
FaWRKY30	CL5306Contig2	0	0	0
FaWRKY31	CL5306Contig3	0	0	0
FaWRKY32	CL5306Contig4	7	7	5
FaWRKY33	CL5624Contig1	1	2	7
FaWRKY34	CL5624Contig2	3	2	4
FaWRKY35	CL6173Contig1	3	11	3
FaWRKY36	CL6173Contig2	14	14	6
FaWRKY37	CL6586Contig1	253	183	234
FaWRKY38	CL6852Contig1	22	27	24
FaWRKY39	CL6852Contig2	20	21	25
FaWRKY40	CL7041Contig1	29	41	29
FaWRKY41	CL8092Contig1	8	19	3
FaWRKY42	CL8105Contig1	31	68	17
FaWRKY43	CL8227Contig1	31	27	22
FaWRKY44	CL8376Contig1	75	84	89
FaWRKY45	CL8668Contig1	205	250	162
FaWRKY46	CL9443Contig1	51	40	71
FaWRKY47	CL11308Contig1	139	137	206
FaWRKY48	CL11794Contig1	52	53	38
FaWRKY49	CL13152Contig1	16	32	42
FaWRKY50	CL15072Contig1	3	5	2
FaWRKY51	CL15370Contig1	196	194	171
FaWRKY52	CL15580Contig1	660	362	101
FaWRKY53	CL26081Contig1	2	13	2
FaWRKY54	lcl|ORF14 CDS CL309Contig2	0	0	0
FaWRKY55	lcl|ORF9 CDS CL1918Contig2	0	0	0
FaWRKY56	lcl|ORF10 CDS CL1918Contig4	0	0	0
FaWRKY57	CL2718Contig1	210	196	149

Tabela 3 (Continuação). Contagem de *reads* nas sequencias putativas em *F. ananassa*

Nome	Contig	Reads		
		C	EH	ES
FaWRKY58	CL2754Contig1	0	0	0
FaWRKY59	CL2754Contig2	1	3	4
FaWRKY60	CL2754Contig5	0	0	0
FaWRKY61	CL10605Contig1	2	2	2
FaWRKY62	lcl|ORF17 CDS Locus_5168	3	7	12
FaWRKY63	lcl_ORF9_CDS Locus_5598	0	0	0
FaWRKY64	lcl|ORF3_CDS Locus_12707	0	0	0

Tabela 4. Leitura da concentração de RNAs no NanoVue Plus (Healthcare Life Sciences).

Identificação	RNA	Concentração [ ] ng/ µL	A_{260}/A_{280}
1	E1R1	184,4	1,92
2	E1R2	128,8	1,91
3	E1R3	148,0	2,04
4	E2R1	136,4	1,33
5	E2R2	107,6	1,88
6	E2R3	94,8	1,99
7	E3R1	103,6	1,91
8	E3R2	114,4	1,89
9	E3R3	131,6	1,90
10	E4R1	112,8	1,68
11	E4R2	171,6	1,93
12	E4R3	106,8	1,92
13	E5R1	185,6	1,93
14	E5R2	168,0	1,90
15	E5R3	118,8	1,88
16	E6R1	185,2	1,93
17	E6R2	136,0	1,91
18	E6R3	125,6	2,03
19	Raíz R1R14	255,0	1,90
20	Raíz R1R34	76,0	2,08
21	Raíz R1R23	138,0	1,78
22	Folha F1R11	146,8	1,86
23	Folha F1R22	126,8	1,86
24	Folha F1R31	136,8	1,87

E1- 7 dias, E2- 14 dias, E3- 18 dias, E4- 21 dias, E5- 24 dias, E6- 28 dias pós-antese, F- folha e R- raiz.

Antes de realizar a RT-qPCR, os *primers* foram testados utilizando eletroforese em gel 1,2% de agarose, de forma a verificar os que apresentaram amplificação em amostras de frutos maturos (E6) e, também, de modo a determinar as condições ideais de amplificação para a posterior reprodução em RT- qPCR que é um método mais oneroso e trabalhoso.

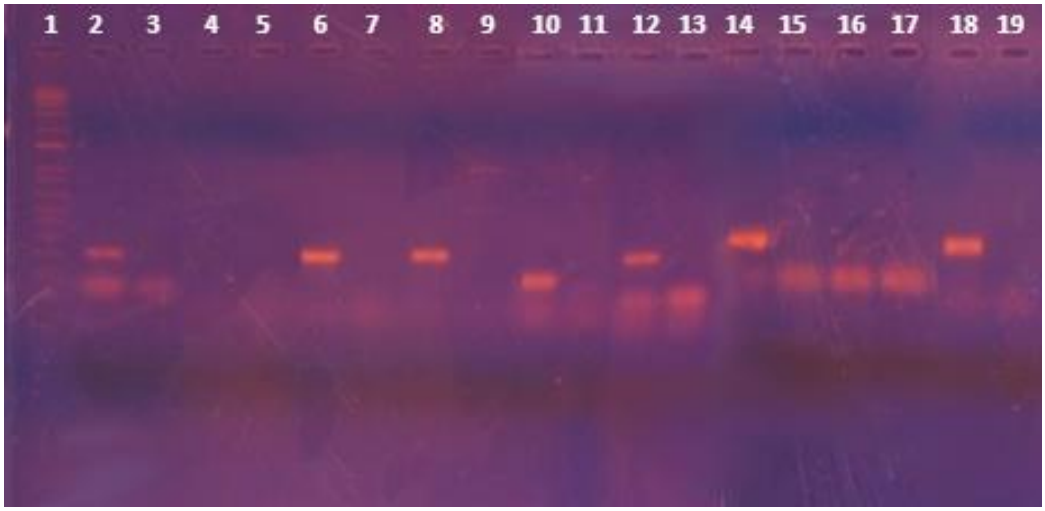

Figura 5. Gel de agarose apresentando a amplificação dos genes *FaWRKYs.* Sendo que: **1 –** Marcador 1kb plus; **2 -** *FaWRKY10* – E6R1; **3 –** *FaWRKY10* – água (controle negativo); **4 –** *FaWRKY*18 – E6R1; **5 -** *FaWRKY*18 – água (controle negativo); **6 –** *FaWRKY*20 – E6R1; **7 –** *FaWRKY*20 – água (controle negativo); **8 –** *FaWRKY*37 – E6R1; **9–** *FaWRKY*37 – água (controle negativo); **10 –** *FaWRKY*45 – E6R1, **11–** *FaWRKY*45 – água (controle negativo); **12 –** *FaWRKY*47 – E6R1; **13 –** *FaWRKY*47 – água (controle negativo); **14 –** *FaWRKY*51 – E6R1; **15 –** *FaWRKY*51 – água (controle negativo); 16 – *FaWRKY*52 – E6R1; **17 –** *FaWRKY*52 – água (controle negativo); **18 –** *FaWRKY57* – E6R1; **19 –** *FaWRKY*57 – água

Com o resultado da PCR, pode-se analisar que *FaWRKY10, FaWRKY18, FaWRKY*20, *FaWRKY*37, *FaWRKY*45, *FaWRKY*47, *FaWRKY*51, *FaWRKY57,* apresentaram amplificação durante o estádio 6 de desenvolvimento, sugerindo uma possível relação com o processo de maturação de frutos, sendo a *Fa*WRKY10, *Fa*WRKY20, *Fa*WRKY37 e a *Fa*WRKY47 as selecionadas para analisar a expressão em RT-qPCR. *FaWRKY10, FaWRKY*45, *FaWRKY*47 e *FaWRKY*51 apresentaram sobra de *primers*, indicando que uma quantidade menor deve ser utilizada nas reação de RT-qPCR. Nenhum fragmento inespecífico foi identificado por PCR.

A análise da expressão gênica por RT-qPCR permitiu identificar alguns possíveis papéis dos quatro genes *FaWRKYs* avaliados (Figura 9). *FaWRKY10*

e *FaWRKY47* apresentam perfis similares, com expressões basais nos diferentes estádios e com maior expressão em raiz (ao menos em *FaWRKY10*), seguido de folha. *FaWRKY37* apresentou maior expressão em estádios intermediários de desenvolvimento e na raiz. O gene *FaWRKY20* por sua vez, foi o único que apresentou expressão maior no fruto do que raiz e folha, mostrando aumento da expressão ao longo do desenvolvimento, sugerindo seu papel no processo de amadurecimento.

Tais genes possuem a seguinte divisão segundo a análise filogenética: *Fa*WRKY10 pertence ao grupo IId; *Fa*WRKY20 e *Fa*WRKY47 ao grupo I e *Fa*WRKY37 ao grupo IIb. *Fa*WRKY47 se mostrou *downregulated* em condições de estresse salino e hídrico; enquanto que *Fa*WRKY20 se mostrou *downregulated* apenas em condições de estresse salino, e *Fa*WRKY37 se mostrou *upregulated* em estresse hídrico e *downregulated* para estresse salino (Figura 5).

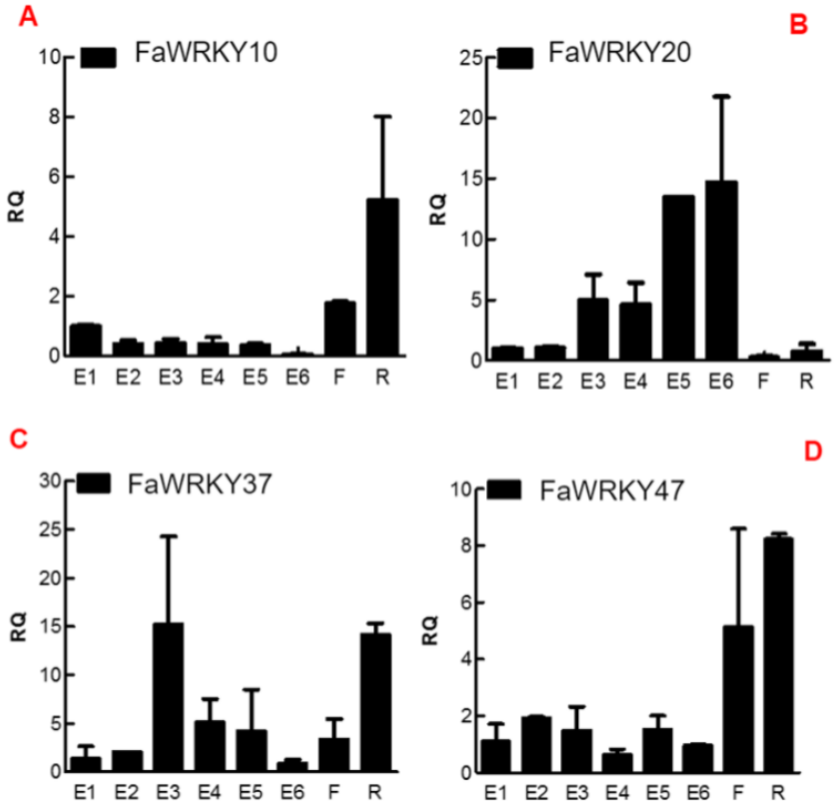

Figura 6. Análise da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição do tipo WRKYs identificadas em morangos em diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento. A – Expressão da cópia *Fa*WRKY10. B – Expressão da cópia FaWRKY20. C - Expressão da cópia *Fa*WRKY37. D - Expressão da cópia *Fa*WRKY47. Os valores de quantificação relativa estão

expressos em média ± desvio padrão; E1- 7 dias, E2- 14 dias, E3- 18 dias, E4- 21 dias, E5- 24 dias, E6- 28 dias pós-antese, F- folha e R- raiz.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível identificar e caracterizar 64 cópias de *Fa*WRKYs em morangos, ampliando o conhecimento prévio sobre tal família gênica. As análises de expressão gênica in silico permitiram constatar uma relação entre os fatores de transcrição do tipo WRKY com resposta a estresse salino e hídrico, bem como a análise por PCR em Tempo Real indicou sua participação no processo de amadurecimento do fruto.

Estes resultados contribuirão para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas com o objetivo de obter cultivares mais resistentes a estresses osmóticos. Estudos promovendo superexpressão e silenciamento dos diferentes genes poderá auxiliar na descrição dos diferentes papéis por eles exercidos, além de permitir melhor compreensão da resposta promovida pelo estresse ao morango. Outra contribuição será em elucidar mecanismos de amadurecimento e senescência dos frutos de modo a propor alternativas biotecnológicas que possam contribuir para um produto ainda mais palatável, com maior valor nutricional agregado e possivelmente com um tempo de prateleira maior.

7 REFERÊNCIAS

BAI, Y., SUNARTI, S., KISSOUDIS, C., VISSER, R. G. F., & VAN DER LINDEN, C. G. The Role of Tomato WRKY Genes in Plant Responses to Combined Abiotic and Biotic Stresses. **Frontiers in Plant Science,** 2018. 9.doi:10.3389/fpls.2018.00801

Biochem. Biophys. Res. Commun. 464, 962–968. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.085

BIRNBAUM K, SHASHA DE, WANG JY, JUNG JW, LAMBERT GM, GALBRAITH DW, BENFEY PN: A gene expression map of the Arabidopsis root. **Science**, 2003, 302:1956-1960.

Chen, Y., Grimplet, J., David, K., Castellarin, S. D., Terol, J., Wong, D. C. J., … Chervin, C. Ethylene receptors and related proteins in climacteric and non-climacteric fruits. **Plant Science**, 2018. 276, 63–72. doi:10.1016/j.plantsci.2018.07.012

CHEN, L., YANG, Y., LIU, C., ZHENG, Y., XU, M., WU, N., SHEN, L. Characterization of WRKY transcription factors in Solanum lycopersicum reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2015. 464(3), 962–968. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.085

CHERIAN, S., FIGUEROA, C. R., & NAIR, H. “Movers and shakers” in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. **Journal of Experimental Botany**, 2014, 65(17), 4705–4722. doi:10.1093/jxb/eru280

CHU, X., WANG, C., CHEN, X., LU, W., LI, H., WANR, L., et al. The cotton WRKY gene GhWRKY41 positively regulates salt and drought stress tolerance in transgenic Nicotiana benthamiana. **PLoS One,** 2015. 11:e0157026. doi: 10.1371/ journal.pone.0143022

DING, Z. J., YAN, J. Y., Li, C. X., Li, G. X., Wu, Y. R., and Zheng, S. J. Transcription factor WRKY46 modulates the development of Arabidopsis lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. **Plant J**. 2015. 84, 56–69. doi: 10.1111/tpj.12958

EULGEM, T. and SOMSSICH, I.E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Curr. Opin. **Plant Biol**. 2007. 10, 366–371

GALLI, V., MESSIAS, R. S., GUZMAN, F., PERIN, E. C., MARGIS, R., & ROMBALDI, C. V. Transcriptome analysis of strawberry (Fragaria × ananassa) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**. 2018. doi:10.1111/ppl.12861

GALLI, V., BOROWSKI, J. M., PERIN, E. C., MESSIAS, R. DA S., LABONDE, J., PEREIRA, I. DOS S., ROMBALDI, C. V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, 2015. 554(2), 205–214. doi:10.1016/j.gene.2014.10.049

GILL, S. S., & TUTEJA, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 48(12), 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016

GOEL, R., PANDEY, A., TRIVEDI, P. K., & ASIF, M. H. Genome-Wide Analysis of the Musa WRKY Gene Family: Evolution and Differential Expression during Development and Stress. **Frontiers in Plant Science**, 2016. 7. doi:10.3389/fpls.2016.00299

HE, G.-H., XU, J.-Y., WANG, Y.-X., LIU, J.-M., LI, P.-S., CHEN, M., et al. Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in Arabidopsis. **BMC Plant Biol**, 2016. 16:116. doi: 10.1186/s12870-016-0806-4

HUANG, S., GAO, Y., LIU, J., PENG, X., NIU, X., FEI, Z., ET AL. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in Solanum lycopersicum. Mol. **Genet. Genomics** 287, 495–513. doi: 10.1007/s00438-012-0696-6, 2012

HUANG T, DUMAN JG. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, Solanum dulcamara. **Plant Mol Biol** 2002, 48:339-350.

ISHIGURO, S. AND NAKAMURA, K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. **Mol. Gen. Genet**. 244, 563–571, 1994

JIANG, J; XI, H; DAI, Z; LECOURIEUX, F; YUAN , L; LIU, X; PATRA, B; WEI , Y; LI, S; AND WANG L. VvWRKY8 represses stilbene synthase gene through direct interaction with VvMYB14 to control resveratrol biosynthesis in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, 2018, ery401, https://doi.org/10.1093/jxb/ery401

JOHNSON CS, KOLEVSKI B, SMYTH DR. Transparent testa glabra2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. **Plant Cell** 2002, 14:1359-1375

KENIRY, A., HOPKINS, C. J., JEWELL, E., MORRISON, B., SPANGENBERG, G. C., EDWARDS, D., & BATLEY, J. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from Fragaria x ananassa expressed sequences. **Molecular Ecology Notes**, 2016, 6(2), 319–322. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01215.x

LIANG, Q.-Y., WU, Y.-H., WANG, K., BAI, Z.-Y., LIU, Q.-L., PAN, Y.-Z., et al. Chrysanthemum WRKY gene DgWRKY5 enhances tolerance to salt stress in transgenic chrysanthemum. **Sci. Rep.** , 2017, 7:4799. doi: 10.1038/s41598-017-05170-x

MESSIAS, R.S., GALLI, V., BOROWSKI, J., BUSS, J., NORA, L., MARGIS, R., ROMBALDI, C.V. Isolation of high quality RNA from grains of different maize varieties. Prep. **Biochem. Biotechnol**. 2014. http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2013.868355.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, 2006. 11(1), 15–19. doi:10.1016/j.tplants.2005.11.002

RUSHTON, P. J., SOMSSICH, I. E., RINGLER, P., AND SHEN, Q. J. WRKY transcription factors. **Trends Plant Sci.** 2010. 15, 247–258. doi: 10.1016/j.tplants.2010. 02.006

RUSHTON, P.J. et al. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. **EMBO J.**1996. 15, 5690–5700

SHEN, H., LIU, C., ZHANG, Y., MENG, X., ZHOU, X., CHU, C., et al. OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. **Plant Mol**. Biol. 80, 241–253. doi: 10.1007/s11103-012-9941-y, 2012

SAUNDERS, N.A Real-time PCR In: **Methods Mol Biol** 266: 191-211, 2004.

SUN, X.-C., GAO, Y.-F., LI, H.-R., YANG, S.-Z., and LIU, Y.-S. Over-expression of SlWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. **J. Plant Biol.** 58, 52–60, 2015. doi: 10.1007/s12374-014-0407-4

WANG, W., VINOCUR, B., SHOSEYOV, O., & ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science,** 9(5), 244–252, 2014. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.006

WANG, W.X. et al. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta** , 2008. 218, 1–14

WANG, C., DENG, P., CHEN, L., WANG, X., MA, H., HU, W., et al. A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. **PLoS One**, 2013. 8:e65120. doi: 10.1371/journal.pone. 0065120

WANG, X., ZENG, J., LI, Y., RONG, X., SUN, J., SUN, T., et al. Expression of a WRKY44, a wheat WRKY gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. Front. **Plant Sci**, 2015. 6:615. doi: 10.3389/fpls.2015.00615

ÜLKER, B., & SOMSSICH, I. E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. **Current Opinion in Plant Biology**, 2004. 7(5), 491–498. doi:10.1016/j.pbi.2004.07.012

V.A. BAPAT, P.K. TRIVEDI, A. GHOSH, V.A. SANE, T.R. GANAPATHI, P. NATH, Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene, **Biotechnol. Adv**. 28, 2015. 94–107.

ZHOU H, LI Y, ZHANG Q, REN S, SHEN Y, QIN L, ET AL. Genome-Wide Analysis of the Expression of WRKY Family Genes in Different Developmental Stages of Wild Strawberry (Fragaria vesca) Fruit. **PLoS ONE**, 2016. 11(5): e0154312.