

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



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*,
CYCLOIDEA e *PCF1* (TCP) em *Fragaria x ananassa***

Gustavo Henrique Camozatto

Pelotas, 2021

Gustavo Henrique Camozatto

**Caracterização de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*,
CYCLOIDEA e *PCF1* (TCP) em *Fragaria x ananassa***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Doutora Vanessa Galli

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C185c Camozatto, Gustavo Henrique

Caracterização de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1* (TCP) em *Fragaria x ananassa* / Gustavo Henrique Camozatto ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2021.

47 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Morango. 2. Maturação. 3. Estresses abióticos. 4. Família gênica. 5. Bioinformática. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 634.75

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Gustavo Henrique Camozatto

Caracterização de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1* (TCP) em *Fragaria x ananassa*

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

Data da Defesa: 10/06/2021

Banca examinadora:

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

M(a). Rosane Lopes Crizel
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

M(a). Audrey Christina do Nascimento
Mestra em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a minha mãe, Rosimeire, por me dar o apoio necessário.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a mim, pelo esforço que possibilitou a realização deste trabalho.

A minha mãe, pela confiança em me deixar realizar um curso de graduação tão longe de casa.

A minha grande amiga Amália, por me incentivar a não desistir, e mostrar que sou capaz mesmo quando eu não acreditava ser.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Galli, pela paciência e compreensão, além, é claro, dos ensinamentos que levarei para a vida.

A minha orientadora de estágio Rosane, e a Audrey, por me ajudarem com minhas dificuldades ao longo da realização deste trabalho. Sem elas, teria sido bem mais complicado, disso tenho certeza.

Aos professores da Biotecnologia, em especial a professora Luciana, não só pelos conhecimentos passados, mas também pela profunda vontade em se conectar aos alunos e criar laços de amizade.

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

E aos demais integrantes do laboratório pelo companheirismo e bons momentos.

“A coerência de um hábito cultural somente pode ser analisada a partir do sistema a que pertence” (Roque de Barros Laraia, 1986).

Resumo

CAMOZATTTO, Gustavo Henrique. **Caracterização de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1 (TCP)* em *Fragaria x ananassa***. Orientadora: Vanessa Galli. 2021. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O morango é um pseudofruto do gênero *Fragaria* extensivamente cultivado no mundo e apreciado por suas características sensoriais, como sabor, cor e aroma, além da presença de compostos bioativos. Embora as tecnologias de cultivo tenham aumentado sua produção, ainda existem fatores que a limitam; particularmente os estresses abióticos, como o estresse osmótico. Outro desafio, é a elucidação dos mecanismos bioquímicos e moleculares que ocorrem durante o processo de amadurecimento deste pseudofruto, a fim de desenvolver tecnologias que reduzam os impactos negativos dos estresses abióticos e perdas pós-colheita. Portanto, o estudo de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes responsáveis pelo processo de maturação e defesa contra estresses são essenciais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura gênica dos membros da família de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1 (FaTCP)* e aferir relações filogenéticas e rede de interações que envolvem estes fatores de transcrição em *Fragaria x ananassa*. Para tal, foi utilizado o banco de fatores de transcrição vegetal Plant TFDB, no qual foram obtidas 15 sequências codificadoras, confirmadas pela existência de domínios específicos desta família gênica. A análise filogenética permitiu identificar sequências que sejam homólogas às sequências de outras espécies vegetais nas quais as funções dessa família estão melhor caracterizadas. As redes de interações possibilitaram a identificação de proteínas que estão envolvidas com resistência a estresses, tais como STOP1 (sensível a rizotoxicidade de prótons 1); TFbHLH47 (fator de transcrição hélice-alça-hélice básica 47); RZ1B (ribonucleoproteína heterogênea RZ1B) e VOZ1 (planta vascular dedo de zinco 1); síntese e degradação de carotenoides, tais como CRTISO (prolicopeno isomerase); CCD8 (dioxigenase de clivagem de carotenoides 8) e D27 (betacaroteno isomerase D27); metabolismo de hormônios, incluindo ABA3 (cofator sulfurease de molibdênio) e GA2OX2 (giberelina 2-beta-dioxigenase 2). Esses resultados contribuem para elaboração de técnicas biotecnológicas, que visem minimizar os efeitos negativos causados por estresses abióticos em plantas de morango, cooperando com o fortalecimento da cultura do morangueiro no Brasil.

Palavras-chave: Morango; maturação; estresses abióticos; família gênica; bioinformática.

Abstract

CAMOZATTTO, Gustavo Henrique. **Characterization of *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1 (TCP)* transcription factors in *Fragaria x ananassa***. Advisor: Vanessa Galli. 2021. 45f. Undergraduate Thesis (Bachelor's Degree in Biotechnology) – Technology Development Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas – Rio Grande do Sul, Brazil, 2021.

Strawberry is a pseudo-fruit of the *Fragaria* species, extensively cultivated worldwide and appreciated for its sensory characteristics, such as flavor, color, and aroma, besides the presence of bioactive compounds. Although cultivation technologies have increased its production, there are still factors that limit it; particularly abiotic stresses, such as osmotic stress. Another challenge is the elucidation of the biochemical and molecular mechanisms that occur during the ripening process of this pseudo-fruit, in order to develop technologies that reduce the negative impacts of abiotic stresses and post-harvest losses. Therefore, the study of transcription factors that control the expression of genes responsible for the ripening process and defense against stresses is essential. This study aimed to characterize the gene structure of the *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* and *PCF1 (FaTCP)* transcription factors family and to assess phylogenetic relationships and network interactions involving these transcription factors in *Fragaria x ananassa*. For this purpose, the Plant TFDB plant transcription factor databank was used, in which 15 coding sequences were obtained, as confirmed by the existence of specific domains of this gene family. The phylogenetic analysis allowed to identify sequences that are homologous to sequences from other plant species in which the functions of this gene family are better characterized. The interaction networks allowed the identification of proteins that are involved in stress resistance, such as STOP1 (sensitive to próton rhizotoxixity 1); TFbHLH47 (basic helic-loop-helix transcription factor 47); RZ1B (heterogenous ribonucleoprotein RZ1B) and VOZ1 (one-zinc finger vascular plant 1); synthesis and degradation of carotenoids, such as CRTISO (prolycopene isomerase), CCD8 (carotenoid cleavage dioxygenase 8) and D27 (beta-carotene isomerase D27); hormone metabolism, including ABA3 (molybdenum cofactor sulfurase 3) and GA2OX2 (gibberellin 2-beta-dioxygenase 2). These results contribute to the development of biotechnological techniques, which aim to minimize the negative effects caused by abiotic stresses in strawberry plants, cooperating with the strengthening of the strawberry crop in Brazil.

Keywords: Strawberry; maturation; abiotic stresses; gene family; bioinformatic.

Lista de Figuras

Figura 1	Domínios proteicos presentes em <i>Fa</i> TCPs.....	31
Figura 2	Motivos proteicos presentes em <i>Fa</i> TCP.....	32
Figura 3	Análise filogenética de genes TCP de morango.....	34
Figura 4	Rede de interação de <i>Fa</i> TCPs em <i>F. ananassa</i>	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABA	Ácido Abscísico
bHLH	Hélice-alça-hélice básica
CDPKs	Quinases dependente de cálcio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FT	Fatores de Transcrição
RBOH	Do inglês, Respiratory burst oxydase homolog
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
SOS	Do inglês, <i>Salt Overly Sensitive</i>
TCP	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA e PCF1
Y2H	Duplo híbrido em leveduras; do inglês, <i>Yeast Two-Hybrid</i>

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 Objetivo.....	11
2 Referencial teórico.....	12
2.1 O morango.....	12
2.2 Estresses abióticos.....	14
2.3 Maturação de frutos.....	16
2.4 Fatores de transcrição TCPs.....	17
2.5 O papel das proteínas TCPs na resposta a estresses abióticos.....	19
2.6 O papel das proteínas TCPs no amadurecimento de frutos.....	21
2.7 Ferramentas de bioinformática para predição de fatores de transcrição...	24
3 Metodologia.....	27
3.1 Análises de genômica estrutural em TCPs de <i>Fragaria x ananassa</i>	27
3.2 Análise filogenética de TCPs em <i>Fragaria x ananassa</i>	27
3.3 Rede de interação entre TCPs.....	28
4 Resultados.....	29
4.1 Análises de genômica estrutural em TCPs de <i>Fragaria x ananassa</i>	29
4.2 Motivos proteicos presentes em FaTCP.....	31
4.3 Análise Filogenética de TCP.....	32
4.4 Rede de interação entre TCPs.....	34
5 Conclusão.....	40
Referências.....	41

1 Introdução

No decorrer do quarto semestre do curso de Bacharelado em Biotecnologia, me deparei com a oportunidade de ser estagiário de iniciação científica, através de um processo de seleção, pelo Grupo de Pesquisa em Genômica Vegetal, para o qual fui admitido para participar sob orientação da professora Dr. Vanessa Galli. Após algumas semanas de trabalho, fui contemplado com uma bolsa de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no projeto intitulado “Identificação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos processos de amadurecimento e de biofortificação de frutos de morango submetidos a estresses osmóticos”, e em seguida, fui bolsista, novamente, durante a prorrogação do mesmo projeto, porém desta vez com bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Durante o período como bolsista, o primeiro estudo que desenvolvi foi com a família de proteínas transmembrana *Respiratory Burst Oxidase Homolog* (RBOH), responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) onde pude identificar e caracterizar possíveis sequências gênicas que codificavam para RBOHs em *Fragaria x ananassa*, como também compreender melhor a atuação dessas proteínas em plantas. O estudo foi apresentado durante o XXVIII Congresso de Iniciação Científica e VII Simpósio de Biotecnologia, ambos eventos realizados na Universidade Federal de Pelotas.

Após a finalização do trabalho com as RBOHs, iniciei meus estudos com a família de fatores de transcrição *TEOSINTE BRANCHED 1*, *CYCLOIDEA* e *PCF1* (TCP). Os membros dessa família são classificados como fatores de transcrição, devido a sua capacidade de ligar-se em regiões promotoras de genes, e regular sua transcrição positiva ou negativamente. Para que essa ligação ocorra, as isoformas de TCP contam com uma região conservada que molda uma hélice-alça-hélice básica (bHLH) intitulada como “domínio TCP”.

Desde a descoberta da família gênica TCP, estudos vêm sendo realizados em diferentes espécies vegetais, a fim de elucidar sua atuação no controle de diversos processos biológicos. Essas proteínas são capazes de regular o desenvolvimento de órgãos como folhas, flores e pêlos radiculares, bem como auxiliar em condições de estresses bióticos e abióticos, e isso ocorre em virtude de sua habilidade de promover a biossíntese de hormônios vegetais e compostos bioativos. Logo, a relação das TCPs

em diferentes contextos ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal, e a escassez de trabalhos relacionando as mesmas com estresses abióticos e o processo de amadurecimento dos frutos de *Fragaria x ananassa*, fazem com que se torne necessária a investigação dessa família de fatores de transcrição na espécie.

1.1 Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar a estrutura gênica, aferir relações filogenéticas e investigar as redes de interações envolvendo fatores de transcrição TCPs em morango (*Fragaria x ananassa*).

1.2 Objetivos Específicos

- Obter as características de *FaTCPs* através de ferramentas de bioinformática, bem como realizar a busca por motivos proteicos nos genes de *FaTCPs*.
- Aferir relações filogenéticas entre as *FaTCPs*.
- Obter as redes de interações com homólogos em *Fragaria vesca* das proteínas *FaTCPs*.

2 Referencial Teórico

2.1 O Morango

O gênero *Fragaria*, pertence à família *Rosaceae* e conta com um número aproximado de 24 espécies espalhadas pelo continente europeu, americano e asiático (DIMEGLIO *et al.*, 2014). Estas plantas produzem o fruto morango, o qual, na verdade, trata-se de um pseudofruto resultante do desenvolvimento do receptáculo floral, sendo que os frutos verdadeiros são os aquênios, localizados no exterior do receptáculo, popularmente chamados de sementes. Por conveniência, ao longo do texto, o morango será referido como fruto.

A espécie *Fragaria chiloensis* localizada na região do Chile e Peru foi descoberta por exploradores no século XVIII, e foi possível perceber sua capacidade de produzir frutos maiores que os das espécies presentes na região norte da Europa como a *Fragaria vesca*. Em 1714, um importante evento aconteceu, graças ao botânico e membro do exército francês Amédée François Frézier. Amédée foi enviado ao Peru e ao Chile em uma missão militar e em seu retorno à França trouxe consigo exemplares de *Fragaria chiloensis*, distribuindo-as pelo país. Isso possibilitou um evento de hibridização natural que ocorreu na cidade de Brest, entre a espécie *Fragaria virginiana* e a recém-chegada *Fragaria chiloensis*. Essa hibridização gerou plantas com maior resistência as condições edafoclimáticas da região, bem como manteve a produção de frutos grandes característicos da *Fragaria chiloensis*. Então, o botânico francês Antoine Nicolas Duchesne identificou e caracterizou a nova espécie dando-lhe o nome *Fragaria x ananassa* Duch (WANG *et al.*, 2020).

Devido as suas características de adaptação e produção de um volumoso receptáculo floral, o sucesso da espécie *Fragaria x ananassa* foi notório, e a sua produção logo tomou lugar das espécies *F. moschata* e *F. vesca*. Ambas as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana* são octaplóides, sendo seu híbrido *F. ananassa* também octaplóide. No entanto, isso não é uma regra, visto que a espécie *F. vesca* é um exemplo de espécie diplóide e as *F. orientalis* e *F. corymbosa* são tetraploides, existindo também espécies hexaploides como é o caso da *F. moschata*. Essa característica de poliploidia no gênero *Fragaria* pode ser explicada pela união de gametas $2n$ e a sua não disjunção (LISTON; CRONN; ASHMAN, 2014).

As características sensoriais agradáveis são as principais responsáveis pela popularidade dos frutos de morango ao redor do mundo. Seu aroma e sabor típico, são resultantes do acúmulo de diversos compostos ao longo do seu desenvolvimento, tais como os fenilpropanoides, ácidos hidroxibenzóicos, ácido hidroxicinâmico, taninos hidrolisáveis, antocianinas e açúcares. O consumo *in natura* deste fruto é benéfico a saúde, devido à presença de compostos funcionais como antioxidantes, diversos minerais (cálcio, ferro, magnésio, cobre, zinco, manganês, entre outros) e vitaminas, principalmente o ácido ascórbico (vitamina C) (GIAMPIERI *et al.*, 2012).

No ano de 2019, a produção mundial alcançou valores próximos a 8 milhões de toneladas, sendo que a China foi responsável por cerca de 40% desse montante (FAO. 2019). O Brasil produziu cerca de 165 mil toneladas em 4500 hectares, sendo os estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul os maiores produtores. Nos últimos anos, a cultura do morangueiro tem crescido no país, graças à introdução de variedades mais adaptadas às condições edafoclimáticas, sendo que as cultivares mais presentes são a “Oso Grande” na região Sudeste e “Camarosa”, “Aromas” e “Albion” na região Sul do país (EMBRAPA, 2011). A importância da produção de morango na região de Pelotas não se configura apenas na geração de renda e emprego para os residentes da zona rural, mas também fornece frutos de qualidade para consumo da própria população, como também material biológico para as pesquisas realizadas pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), visto que propriedades produtoras de morango aos arredores do campus Capão do Leão podem fornecer material para eventuais estudos executados nas dependências do *campus*.

Embora o cultivo do morangueiro esteja bem estabelecido, este apresenta desafios que acabam por limitar sua produtividade. Isso ocorre devido à alta demanda de recursos hídricos e nutritivos por parte da planta. A alta demanda por água ocorre por diferentes motivos, entre eles podemos citar o fato de o morangueiro apresentar um sistema radicular pouco profundo no horizonte do solo, ampla área foliar que causa uma transpiração em excesso e frutos grandes com alto teor de água (CONTI; MINAMI; TAVARES, 2002). Assim, a obtenção de plantas resistentes a essas condições de estresses abióticos é importante para aumentar a produtividade e conseqüentemente diminuir o custo de produção. Além dos problemas causados pelos estresses na produtividade, existem as perdas pós-colheita, ocasionadas pela baixa resistência mecânica do fruto e susceptibilidade a infecções fúngicas

(CONTIGIANI *et al.*, 2018).

2.2 Estresses Abióticos

Durante seu ciclo de vida, um organismo vegetal está sujeito a diferentes intempéries que podem ser classificadas quanto a sua origem. Os estresses bióticos são aqueles advindos da interação negativa entre a planta e outros organismos como insetos, fungos e bactérias, enquanto os estresses abióticos referem-se às condições edafoclimáticas como temperatura, disponibilidade de água, luz, e natureza do solo, como presença de metais pesados e excesso de sais em sua fração solúvel (GRANT C KRAMER *et al.*, 2011).

Esses estresses acarretam uma diminuição da fotossíntese e assimilação de nutrientes e água, podendo reduzir em cerca de 70% a produtividade agrícola (FRANCINI; SEBASTIANI, 2019). Isto representa um grande problema, visto que o crescimento da população humana aumenta a demanda por alimentos, o que acaba gerando um avanço da fronteira agrícola através do desmatamento de biomas com grande biodiversidade, como é o caso do Brasil (FILHO, 2016). O desenvolvimento de variedades vegetais com alta produtividade é realizado desde o início das atividades agrícolas, e esse desenvolvimento se deu através da seleção convencional das plantas que melhor atendiam os interesses humanos (BRESEGHELLO; COELHO, 2013). O avanço da biotecnologia nos últimos anos teve um enorme impacto na capacidade de entender os complexos mecanismos por trás do crescimento e desenvolvimento vegetal, possibilitando a descoberta de genes e a caracterização de suas funções.

O impacto desses estresses desencadeia diferentes mecanismos adaptativos através de alterações na expressão gênica e consequente produção de metabólitos secundários necessários para lidar com determinada situação adversa, como compostos fenólicos com capacidade antioxidante (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Para que essas adaptações ocorram, as células vegetais possuem sensores em sua membrana que reconhecem estímulos ambientais, como os *Receptor-like kinases* (RLKs), e ativam vias metabólicas através da fosforilação de quinases intracelulares (OSAKABE *et al.*, 2013), iniciando uma cascata de sinalização que culmina na ativação ou repressão de genes específicos. Uma importante molécula utilizada na sinalização celular são os íons cálcio. O fluxo desses íons entre o

ambiente intracelular e extracelular ocorre através de canais e ao adentrar o citoplasma, são reconhecidos por proteínas que contêm domínios capazes de se ligarem ao Ca^+ como, por exemplo, as CDPKs e RBOHs (RUDD; FRANKLIN-TONG, 1999).

Além dos íons cálcio, as espécies reativas de oxigênio (EROs) apesar de instáveis, também são utilizadas como sinalizadores na interação da planta com seu ambiente, entretanto, para que estas atuem, de fato, como sinalizadores e não danifiquem componentes celulares, as células precisam ajustar os níveis citoplasmáticos de EROs e, para isso, contam com enzimas capazes de regular as quantidades de EROs nas células. As RBOHs, por exemplo, são uma família de proteínas transmembrana que produzem EROs. Essas enzimas possuem o domínio *EF-Hand* responsável pela ligação com o Ca^+ e domínios de ligação ao NADPH e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) responsáveis pela produção de superóxido e peróxido de hidrogênio (TRIPATHY; OELMÜLLER, 2012). Além disso, as células contam com mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (AHMAD *et al.*, 2010), capazes de neutralizar as EROs, tais como a superóxido dismutase, capaz de catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, enquanto a enzima catalase decompõe o peróxido de hidrogênio e está presente nos peroxissomos. O mecanismo não enzimático inclui compostos como o ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, bastante presentes em frutos de morango.

O estresse salino, por exemplo, é desencadeado por altas concentrações de sais, geralmente íons sódio ou cloro na fração solúvel do solo. O aumento da concentração desses solutos diminui o potencial osmótico da água ocasionando uma condição hipertônica que afeta a capacidade da planta em absorver não apenas água, mas também nutrientes como o potássio, um importante íon utilizado na regulação osmótica. Isto ocorre devido a um processo competitivo entre esses íons acarretando uma deficiência de K^+ e consequente desbalanço osmótico (DEINLEIN *et al.*, 2014). Nem todas as espécies vegetais são capazes de resistir a altas concentrações de sais, aquelas que possuem uma tolerância maior a essa condição, são classificadas como halófitas. As plantas halófitas são capazes de absorver cloreto de sódio e armazená-lo nos vacúolos de células da parte aérea (FLOWERS; COLMER, 2015). A *F. ananassa* é uma espécie que pode ser classificada como glicófito, devido à alta sensibilidade a tal condição (GHEYI; DIAS; LACERDA, 2010).

Os três principais mecanismos utilizados pelas plantas para lidar com essa condição de excesso salino incluem: diminuição da absorção; aumento do efluxo e compartimentalização desses íons nos vacúolos, evitando assim seu efeito tóxico quando presente em altas concentrações no citosol (YANG; GUO, 2018). Essa adaptação ocorre através da via *salt overly sensitive* (SOS) que conta com proteínas de membrana que realizam esse efluxo do ambiente citoplasmático para o ambiente extracelular, as SOS1 (ZHANG; FLOWERS; WANG, 2010). Os efeitos causados pelo estresse salino nas células são amplos, conforme evidenciado pela alteração na expressão de genes. Um transcriptoma realizado em plantas de *Arabidopsis thaliana* sob condição de estresse salino demonstrou um aumento na expressão de 932 genes, enquanto outros 367 genes tiveram sua expressão reduzida (SEWELAM *et al.*, 2014). Essas mudanças na transcrição induzem mecanismos de proteção essenciais para manter um crescimento e desenvolvimento adequado, bem como um uso eficiente de energia pelo organismo.

2.3 Maturação de Frutos

Como uma forma de proteção, as angiospermas desenvolveram estruturas que envolvem as sementes e as preservam contra danos mecânicos, perda de água e patógenos. Além disso, essas estruturas facilitam a dispersão das sementes por animais, pela água e pelo vento, conferindo uma enorme vantagem as espécies vegetais que as possuem e isso se torna evidente ao contabilizar mais de 300.000 espécies de angiospermas espalhadas pelo mundo (WANG; RAN, 2014). Várias delas fazem parte da dieta humana como fonte de açúcares, vitaminas e minerais importantes para o nosso desenvolvimento.

A família das Rosáceas possui espécies com frutos de características bastante variadas, como, drupas (carnosos com apenas uma semente), frutos agregados como a framboesa e frutos originados do desenvolvimento do receptáculo floral como é o caso do morango (XIANG *et al.*, 2017). O amadurecimento dos frutos é um processo fisiológico complexo, controlado por diferentes vias de sinalização; mas, de modo geral, são classificados em duas categorias conforme seu perfil de respiração e produção de etileno no decorrer da maturação, os frutos climatéricos e os não-climatéricos (CHEN *et al.*, 2018). Entretanto, vale mencionar que alguns frutos

apresentam tanto um comportamento climatérico quanto não climatérico como é o caso de algumas variedades de melões (OBANDO-ULLOA *et al.*, 2008).

Desde a descoberta do etileno, muito se tem desvendado sobre sua atuação em diferentes processos fisiológicos vegetais como germinação das sementes, desenvolvimento das flores, alongação das raízes, estresses bióticos e abióticos, e amadurecimento dos frutos (LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2012; TAO *et al.*, 2015). No caso da maturação, o etileno desencadeia processos como amolecimento, acúmulo de metabólitos secundários, aumento no teor de açúcares e produção de ácidos orgânicos. Os genes e proteínas que estão envolvidos na biossíntese e sinalização do etileno são bem caracterizados, no entanto, isso não é uma realidade para frutos não-climatéricos como é caso do morango, na qual muitas brechas precisam ser preenchidas para uma compreensão total do processo de maturação nesses frutos (CHEN *et al.*, 2018).

No caso dos frutos não-climatéricos o etileno não apresenta ação significativa sobre o amadurecimento, e estudos apontam um aumento no conteúdo de ácido abscísico (ABA) conforme os frutos se desenvolvem, tornando esse hormônio um candidato no controle da maturação (LI *et al.*, 2011). A aplicação exógena desse hormônio demonstrou acelerar o processo de maturação dos frutos de morango enquanto o silenciamento induzido por vírus (VIGS) do gene FaNCED1 (*9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase*) enzima chave para a biossíntese do ABA, retardou o progresso da maturação (JIA *et al.*, 2011).

Devido as suas características de desenvolvimento rápido, sistema de cultivo que não apresenta grandes dificuldades bem como informações genéticas disponíveis em bancos de dados, o morangueiro se destaca como modelo biológico para investigação dos mecanismos envolvidos no amadurecimento dos frutos classificados como não-climatéricos.

2.4 Fatores de Transcrição TCPs

No processo de transcrição, os chamados “fatores de transcrição” (FTs) são proteínas que apresentam a habilidade de se conectar a sequências promotoras específicas do DNA bloqueando ou promovendo a ligação com as RNAs polimerases, que são responsáveis pela síntese do RNA mensageiro. Os fatores de transcrição podem atuar sozinhos, como também podem interagir com outras proteínas e formar

complexos multiproteicos através da presença de domínios. Existem duas categorias de FTs, os Fatores de Transcrição Basais (FTBs) que são necessários para a expressão dos genes transcritos pela mesma classe de RNA polimerase e encontram-se na maioria das células e sempre com atividade ativadora; já os Fatores de Transcrição Específicos (FTEs) são responsáveis pela transcrição de genes que codificam proteínas requeridas em tipos celulares e momentos específicos do desenvolvimento do organismo, podendo ser ativadores e co-ativadores ou repressores e co-repressores. Os principais motivos estruturais presentes nos FTs encarregados por sua ligação ao DNA, são os dedos de zinco, zíper de leucina, homeodomínio e o hélice-alça-hélice (HLH). Esse último, é constituído de duas alfa-hélices isoladas por uma alça não helicoidal, sendo uma das alfa-hélices constituídas por aminoácidos básicos responsáveis por sua interação com a molécula de DNA que por sua vez apresenta característica ácida.

Os FTs são proteínas importantes na plasticidade vegetal em resposta a diferentes estímulos ambientais e internos, e uma quantidade enorme de proteínas estão envolvidas desde a percepção desses sinais até as mudanças necessárias para manter o metabolismo vegetal ajustado. As TCPs (TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA e PCF1) são uma família de FTEs descoberta no fim da década de 1990 em pesquisas com diferentes espécies vegetais. O gene CYCLOIDEA foi identificado como responsável pela simetria floral em *Antirrhinum majus* (Luo *et al.*, 1996). Em plantas dessa espécie que apresentavam assimetria floral, foi constatado uma metilação nesse gene e conseqüente silenciamento, gerando um fenótipo assimétrico (Cubas *et al.*, 1999).

Um estudo realizado em arroz (*Oryza sativa*) identificou dois fatores de transcrição, os PCF1 e PCF2 (*proliferating cell factor 1 e 2*) responsáveis pela regulação transcricional do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) (KOSUGI; OHASHIL, 1997). Uma proteína auxiliar da DNA polimerase e que participa em processos como replicação e reparo do DNA na região meristemática. Uma mutação no gene *teosinte branched 1* (TB1) foi identificada como responsável pela diferença significativa nas inflorescências do milho (*Zea mays*) em relação ao seu ancestral selvagem teosinto (Doebley *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999). Logo foi descoberto que essas proteínas apresentavam uma região bHLH conservada entre elas, e que faziam parte de uma mesma família de genes que codificavam FTs, sendo denominada TCP (Cubas *et al.*, 1999). O

surgimento dessa família no reino vegetal data entre 650 e 800 milhões de anos, na qual análises filogenéticas apontam que o primeiro indício de sua emergência ocorreu anteriormente à divergência das Zygnematophyceae (algas verdes). No decorrer da evolução das plantas terrestres a duplicação desses genes acarretou em novas funções, o que explica a amplitude de atuação dos membros dessa família nas espécies atuais (NAVAUD *et al.*, 2007).

As isoformas de TCPs são divididas em classe 1 e classe 2, e ambas são capazes de reconhecer regiões promotoras ricas em guanina e citosina, porém, diferem entre si pela composição de aminoácidos, comprimento da segunda hélice do domínio bHLH e pela presença de uma região rica em arginina, denominada domínio R que está presente apenas nas TCPs de classe 2 e é responsável pela interação com outras proteínas (LIU *et al.*, 2019). As TCPs de classe 2 são divididas em outros dois subgrupos, CIN (CINCINNATA) e CYC/TB1, sendo que essa última está presente apenas em angiospermas e possuem um motivo ECE (ácido glutâmico-cisteína-ácido glutâmico) conservado e situado entre o domínio TCP e o domínio R. A preferência de ligação dos membros de ambas as classes está relacionada a presença da glicina na posição 11 ou um ácido aspártico na posição 15 da sequência (VIOLA *et al.*, 2012). Apesar dessa divisão de categorias entre essa família de FTs, membros de diferentes classes podem se ligar na mesma região cis de um promotor, evidenciando que essas isoformas de classes diferentes podem apresentar alvos em comum, e agir antagonicamente através da competição por essas regiões alvo, como é o caso da AtTCP20 (classe 1) capaz de se ligar ao mesmo promotor que a AtTCP4 (classe 2) do gene *LOX2* (*lipoxygenase2*) envolvido na síntese de jasmonato e no processo de desenvolvimento foliar (DANISMAN *et al.*, 2012).

2.5 O papel das proteínas TCPs na resposta a estresses abióticos

Nos últimos anos, tem-se descoberto a atuação de muitas famílias de FTs no processo de adaptação em condições de estresse, sejam eles bióticos ou abióticos, tornando essas proteínas interessantes alvos na obtenção de plantas resistentes a determinados estresses. Após sua descoberta em meados dos anos 90, as pesquisas com os membros da família TCP estavam diretamente relacionadas com o ciclo celular, devido a sua atuação na simetria floral (KOSUGI; OHASHIL, 1997). No entanto, essa relação com o ciclo celular foi dando lugar para uma relação mais forte

dos membros dessa família com a síntese hormonal, quando pesquisas em *Arabidopsis thaliana* comprovaram que as isoformas AtTCP4 e AtTCP20 afetavam o desenvolvimento foliar através da interação direta com genes da biossíntese de metil jasmonato, um fitormônio que desempenha diferentes funções no desenvolvimento vegetal e na resposta contra patógenos e danos mecânicos (DANISMAN *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos a compreensão da atuação dessa família de FTs foi crescendo, e sua relação com a síntese de diversos hormônios foi elucidada. Dentre esses fitormônios estão o ABA (TATEMATSU *et al.*, 2008), citocininas e auxinas (DAS GUPTA; AGGARWAL; NATH, 2014; EFRONI *et al.*, 2013). Além do mais, foi evidenciado o envolvimento desses FTs na relação da planta com patógenos. Plantas de *Arabidopsis thaliana* quando expostas a bactéria fitopatogênica *Macrosteles quadrilineatus* apresentam uma redução no conteúdo de jasmonato devido à dimerização da proteína SAP11 secretada pela bactéria com a AtTCP2, AtTCP3, AtTCP4, AtTCP5, AtTCP10, AtTCP13, AtTCP17 e AtTCP24 causando a redução da atividade dessas isoformas e conseqüente redução nos mecanismos de defesa da planta (PECHER *et al.*, 2019).

Uma das formas pela qual as plantas se adaptam a condições de baixa luminosidade e calor excessivo ocorre através da percepção da luz vermelha e conseqüente mudança na arquitetura da planta via alongação do hipocótilo, região situada entre a inserção dos cotilédones e início da radícula. Em *Arabidopsis thaliana*, esse processo de alongação do hipocótilo pode ser desencadeado por meio da AtTCP4 que se liga e ativa os genes YUCCA2, 5 e 8, envolvidos na biossíntese de auxina, sendo que um aumento na expressão desses genes leva a um aumento na produção de auxina resultando em plantas com hipocótilo alongado devido à expansão das células dessa região (CHALLA; AGGARWAL; NATH, 2016; SUN *et al.*, 2012).

O aumento na biossíntese de antocianinas é necessário em condições de alta luminosidade visto que essas moléculas atuam como antioxidantes que protegem os componentes celulares dos danos causados por EROs. A presença de um resíduo de cisteína no início da hélice do domínio bHLH das AtTCPs 15, 20 e 21 pertencentes a classe 1, indica a modulação dessas isoformas através da oxidação desse resíduo (UBERTI MANASSERO *et al.*, 2013). Em estudos posteriores onde o resíduo de cisteína presente na AtTCP15 foi substituído por um resíduo de serina, foi detectado um decréscimo no acúmulo de antocianinas sob condições de elevada luminosidade

(VIOLA; CAMOIRANO; GONZALEZ, 2016).

Em plantas de *Oryza sativa* expostas a condições de déficit hídrico e estresse salino através do excesso de NaCl, verificou-se um aumento na expressão da OsTCP19, e a expressão heteróloga dessa isoforma em *Arabidopsis thaliana* provocou uma diminuição das raízes laterais e maior tolerância aos estresses abióticos citados acima (MUKHOPADHYAY; TYAGI, 2015). As mudanças no perfil de expressão gênica dos diferentes membros da família TCP sob condições de estresses abióticos em diferentes espécies vegetais são notáveis (LEI *et al.*, 2017; LING *et al.*, 2020) e sua capacidade em conferir resistência a essas condições ambientais desfavoráveis tem sido evidenciada (LIU *et al.*, 2020). Esses estudos têm impactado positivamente na geração de variedades vegetais com maior vigor, podendo auxiliar também na obtenção de linhagens de *F. ananassa* mais adaptadas a condições ambientais adversas.

2.6 O papel das proteínas TCPs no amadurecimento de frutos

Desde seu descobrimento, os membros da família TCP vem sendo relacionados com uma grande variedade de processos importantes em diferentes contextos do crescimento e desenvolvimento vegetal (UBERTI MANASSERO *et al.*, 2013). Os primeiros relatos de sua atuação, estavam relacionados com o processo de ramificação das regiões meristemáticas, essencial na arquitetura das flores (FENG *et al.*, 2006) e não apenas na organização floral, como também foi evidenciado sua atividade na formação dos perfilhos de *Oryza sativa* (arroz), onde uma super expressão do gene *OsTB1* (membro da família TCP) acarretou em uma considerável diminuição no número de perfilhos, enquanto uma mutação que causou a perda de função desse gene, gerou plantas com maior número de perfilhos, o que sugere uma regulação negativa no processo de ramificação lateral do arroz (LI *et al.*, 2020).

Os relatos da atividade dos membros das TCPs de classe 2 no desenvolvimento foliar estão bem estabelecidos (Palatnik *et al.*, 2003; Bresso *et al.*, 2018). Membros da subclasse CIN em *Antirrhinum majus* que sofreram um processo de mutação e consequente perda de função, apresentaram folhas com fenótipo enrugado, devido a alterações na curvatura de superfície ocasionado pelo excesso de proliferação celular em suas margens (NATH *et al.*, 2003). Além disso, estudos relatam a participação de membros dessa família no processo de biogênese

da mitocôndria, a isoforma *AfTCP8* localizada no interior do núcleo das células de *Arabidopsis thaliana*, não apenas se liga a região promotora, como também interage com as proteínas PNM1 (proteínas que participam na expressão de genes mitocondriais) (HAMMANI *et al.*, 2011). Algumas dessas funções se devem ao fato da íntima relação de algumas isoformas com a biossíntese de diferentes fitormônios.

O processo de amadurecimento de frutos está relacionado com diferentes fitormônios e uma ampla gama de FTs que controlam a expressão de genes necessários para o crescimento do fruto e acúmulo de compostos de bioativos (ROHRMANN *et al.*, 2011). A espécie *Musa acuminata* (bananeira) é uma espécie que produz frutos climatéricos e possui 45 membros de TCP em seu genoma, sendo que 25 *MaTCPs* foram caracterizados com base nos transcriptomas obtidos das polpas dos frutos, e através de análises do perfil de expressão, foi identificada uma variação na expressão dessas 25 isoformas ao longo dos estádios de amadurecimento. Três dessas isoformas, a *MaTCP5*, *MaTCP19* e a *MaTCP20* são induzidas por etileno e estão localizadas no núcleo, *MaTCP5* e *MaTCP20* atuam como ativadores, enquanto a *MaTCP19* atua como repressora, ambas dos genes *MaXTH10* e *MaXTH11*, que codificam para proteínas atuantes no processo de amolecimento da polpa durante a maturação (SONG *et al.*, 2018). Outra descoberta importante feita por Chun-bo Song e sua equipe através de ensaios de interação proteica, foi que essas TCPs não atuam sozinhas; elas formam heterodímeros entre si, tanto *in vitro* como *in vivo* e essa interação afeta sua capacidade em se ligar aos genes alvo.

Integrantes do grupo TCP também se mostraram relacionados ao processo de amadurecimento dos frutos de *Solanum lycopersicum* (tomateiro), outro exemplo de fruto climatérico. Nesta espécie, verificou-se que, algumas das 36 isoformas são preferencialmente expressas nos tecidos que compõem o fruto, como a *S/TCP12*, *S/TCP15* e *S/TCP18*. Estas três TCPs são membros da classe 1, cuja expressão é regulada por FTs tidos como importantes no contexto do amadurecimento, os RIN (RIPENING INHIBITOR) e CNR (COLORLESS NON-RIPENING). Os fatores RIN se ligam em fragmentos da região promotora dos três genes, *S/TCP12*, *S/TCP15* e *S/TCP18* enquanto os fatores CNR se ligam apenas no gene *S/TCP18* (PARAPUNOVA *et al.*, 2014).

Como foi possível perceber, grande parte das pesquisas que buscam compreender o papel dessa família de FTs, foram e ainda são realizadas em organismos modelos como a *Arabidopsis thaliana* ou plantas consideradas mais

importantes para a monocultura, como milho e arroz, que contam com centros de pesquisas mais avançados. Os estudos relacionando esses FTs com a maturação de frutos são recentes e escassos, principalmente no gênero *Fragaria*, e no contexto da maturação de frutos não-climatéricos, apesar da importância dessas frutíferas no cenário econômico.

Entretanto, um estudo recente, trouxe à tona uma forte relação de um membro dessa família gênica no processo de maturação dos frutos de *Fragaria vesca* (XIE *et al.*, 2020a) Esse estudo em questão foi realizado na cidade de Shaanxi na China onde Yin-Ge Xie e sua equipe após identificar que a isoforma *FvTCP9* era induzida por tratamento com ABA, decidiram isolar e analisar esse gene para investigar sua atuação no processo de maturação. As plantas de morangueiro foram cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura e umidade, posteriormente, diferentes tecidos foram coletados (raízes, caules, folhas, flores e frutos em diferentes estádios) para análises de transcritos de *FvTCP9*. Posteriormente, realizaram ensaios de expressão transiente através de uma super-expressão e silenciamento por meio do uso de *Virus Induced Gene Silencing* (VIGS), sendo ambos os tratamentos injetados em frutos verdes. No caso do silenciamento, após sete dias da injeção, os frutos do tratamento controle se tornaram totalmente maduros, com característica vermelho intenso, enquanto a superfície dos frutos silenciados continuou embranquecida. Já no experimento de super-expressão mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, os frutos super-expressando *FvTCP9* apresentaram um acúmulo de antocianinas, acelerando o processo de amadurecimento. Conjuntamente, foi executado o ensaio de RT-qPCR nos frutos tratados mencionados acima, para investigar as mudanças no perfil de expressão de genes relacionados com diferentes acontecimentos ao longo dos estádios, como, biossíntese de açúcares, amolecimento, coloração e aroma, e foi visto que frutos que passaram pelo processo de super expressão do gene *FvTCP9* possuíam maior conteúdo de transcritos dos genes *FaQR* (Quinina oxireductase), *FaSUT1* (Transportador de sacarose 1), *FaOMT* (O-metiltransferase), *FaCHI* (Chalcona isomerase).

Ao observar que a expressão transiente de *FvTCP9* afetava o conteúdo de antocianinas, o pigmento mais importante na indicação da maturação dos frutos de morango, foi efetuado um ensaio Y2H (*yeast two-hybrid*) para comprovar a interação com 14 genes da biossíntese de antocianinas em *F. ananassa* sendo que a única

interação detectada foi com o gene de *FaMYB1*, um fator de transcrição que suprime o acúmulo de antocianinas (Ishikawa *et al.*, 2015). A importância dessa pesquisa na elucidação do papel dessa família de fatores de transcrição no amadurecimento do morango é notável, visto que se demonstrou sua interação com genes da biossíntese do principal hormônio regulador desse processo em frutos não-climatéricos, o ABA, bem como dos principais pigmentos, as antocianinas, deixando mais claro suas funções e abrindo portas para futuros estudos em *F. ananassa*.

2.7 Ferramentas de bioinformática para predição de fatores de transcrição

Se entende por bioinformática, a aplicação de técnicas da informática para o estudo de informações biológicas, mas, além disso, é uma área multidisciplinar que envolve biologia, informática, matemática e estatística. A evolução da bioinformática nos últimos anos tem proporcionado aos pesquisadores ferramentas estatísticas, algoritmos, bancos de dados e interfaces de usuário que auxiliam na análise, interpretação e processamento de dados biológicos obtidos através dos ensaios realizados em laboratório. O desenvolvimento das plataformas de sequenciamento tem auxiliado na construção de genomas de diversas espécies de procariotos e eucariotos e esses genomas são depositados em bancos e organizados em cromossomos, mapas, sequências e anotações que facilitam o acesso dos pesquisadores. Esses bancos podem ser acessados em plataformas como a do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que também disponibiliza ferramentas para trabalho com esses dados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Além dos genomas, as plataformas de sequenciamento possibilitam a construção de transcriptomas obtidos através da extração de RNA de tecidos vegetais sob diversas condições de estresses bióticos e abióticos e sob condições temporais de crescimento e desenvolvimento, revelando quais genes estão sendo expressos nessas circunstâncias.

O *Genome Database for Rosaceae* (GDR) é um banco de dados curado que reúne genomas disponíveis para *download*, dos gêneros mais importantes economicamente da família das *Rosaceae*. Dentre eles estão espécies de *Fragaria* (Morango), *Malus* (Maçã), *Prunus* (Pêssego), *Pyrus* (Pêra), *Rosa* (Rosas) e *Rubus* (Framboesa). Além disso, a plataforma conta com ferramentas de mineração de dados e está associada com outros bancos de dados, como o Kegg Pathway Database

(<https://www.genome.jp/>) que conta com diagramas de rotas metabólicas, o NCBI e o InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), que realiza a classificação de famílias proteicas.

Bioinformática estrutural é a área da biologia computacional que analisa e prediz a estrutura tridimensional de macromoléculas dentre elas as proteínas, DNA e RNA. As estruturas proteicas são formadas por sequências longas compostas por vinte resíduos de aminoácidos e que em condições fisiológicas, adotam uma conformação tridimensional que pode estar intimamente relacionada com sua função no organismo. Essas estruturas 3-D podem ser obtidas por diferentes métodos como, cristalografia por difração de raio-X, microscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear. O conhecimento sobre a estrutura das proteínas permite inferir sobre sua provável função, localização subcelular e interação com outras proteínas em processos biológicos e essa estrutura por sua vez é determinada pela sequência de aminoácidos que ela possui, por exemplo, proteínas de membrana tendem a possuir regiões com aminoácidos hidrofóbicos, enquanto proteínas citoplasmáticas possuem aminoácidos hidrofílicos. No caso dos FTs, suas sequências comumente possuem regiões com aminoácidos de característica básica em seu domínio de ligação à sequência de DNA. Além das técnicas citadas anteriormente, é possível prever a estrutura tridimensional das proteínas com *softwares* como o PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Um *software* de código aberto disponibilizado gratuitamente.

Atualmente, a deposição de sequências curadas de DNA, RNA e proteínas em bancos de dados tem auxiliado muito a identificação e caracterização de sequências cuja função é desconhecida, através desses bancos é possível por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), cruzar a sequências da qual não se sabe a função com as sequências curadas presentes nesses bancos. O algoritmo do BLAST, encontra regiões que apresentem similaridade entre as sequências de aminoácidos e nucleotídeos e calcula a significância estatística entre elas. Essa ferramenta pode inferir relações evolutivas, funcionais e identificar membros de famílias gênicas. Existem diferentes tipos de BLAST, o “*NucleotideBLAST*” que faz uso apenas de sequências nucleotídicas, sendo o resultado também em sequências de nucleotídeos, o “*Protein BLAST*”, onde se utiliza sequências proteicas, onde o resultado é apresentado em sequências proteicas; o “*blastx*”, onde a sequência de entrada é nucleotídica e o resultado é dado em

sequência proteica; e o “tblastn”, em que a sequência de entrada é proteica e o resultado é em sequência de nucleotídeos.

O banco de dados mais importante para a realização desse trabalho foi o *Plant Transcription Factor Database* (PlantTFDB) (<http://plantfdb.gao-lab.org>). Neste banco de dados encontram-se todas as famílias de FTs identificadas e caracterizadas até o momento, possuindo 320,370 TFs de 165 espécies de plantas e classificados em 58 famílias, sendo uma delas a família TCP. Nesse banco de dados foi possível realizar o download das sequências nucleotídicas das isoformas de TCP de *Fragaria x ananassa*, *Fragaria vesca* e *Arabidopsis thaliana* para realizar as análises descritas ao longo desse estudo.

3 Metodologia

3.1 Análises de genômica estrutural em TCPs de *Fragaria x ananassa*

As sequências gênicas correspondentes às diferentes isoformas de *FaTCP* foram baixadas do banco de dados de FTs vegetais *Plant* TFDC (<http://plantfdb.gao-lab.org/>) e reunidas em um arquivo FASTA para realizar as análises descritas a seguir.

As informações de ponto isoelétrico e peso molecular referentes a cada membro da família *FaTCP* foi realizada utilizando a ferramenta ComputeI/Mw da plataforma ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Além disso, foi realizado a predição de localização subcelular, na qual as sequências de aminoácidos foram submetidas ao preditor de localização para eucariotos DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>).

Para a predição de domínios proteicos, foi empregue a ferramenta PROSITE presente na plataforma ExPASy (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS51369>). De modo a identificar os motivos proteicos presentes em cada isoforma, foi necessário utilizar o programa MEME, Multiple EM for MotifElicitation (<http://meme-suite.org/tools/meme>).

3.2 Análise filogenética de TCP's em *Fragaria x ananassa*

As sequências de nucleotídeos relativas às diferentes isoformas de *FaTCP*, *FvTCP* e *AtTCP* foram obtidas através do download no banco de dados de FTs vegetais *Plant* TFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/>) e reunidas em um arquivo FASTA. Através da plataforma *ClustalOmega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), foi efetuado o alinhamento dessas sequências e posteriormente o arquivo foi convertido em formato MEGA para possibilitar a construção da árvore filogenética pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X* (MEGA) aplicando o método *Neighborjoining* com um total de 500 *bootstraps*.

3.3 Rede de interação entre TCPs

As redes de interações específicas usando *co-expression*, mineração de texto, bancos de dados, proximidade, fusão gênica, co-ocorrência e evidências experimentais, com os homólogos em *Fragaria vesca* das proteínas *FaPCF1*, *FaDICHOTOMA*, *FaTCP4-2*, *FaTCP5*, *FaTCP7*, *FaTCP14*, *FaHMG-CoA* sintase, *FaTCP18*, *FaTCP19* e *FaTCP20*, foram construídas através da plataforma online STRING 11.0 (<https://string-db.org/>). A função das proteínas presentes nestas redes de interações foi verificada através do site UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A partir desta análise, foram selecionadas as proteínas com funções associadas aos processos de amadurecimento de frutos e resposta a estresses.

4 Resultados

4.1 Análises de genômica estrutural em TCPs de *Fragaria x ananassa*

Para a realização dessa etapa, foi efetuado uma busca de *FaTCPs* em morango (*Fragaria x ananassa*) e quinze putativas sequências foram obtidas a partir do bando de FTs “*Plant TFDB*”, que reúne diversas famílias de FTs em plantas. Para verificar a confiabilidade dessas sequências comprovou-se a presença de domínios típicos de TCP utilizando a ferramenta PROSITE. O domínio intitulado TCP forma uma hélice-alça-hélice básica não canônica com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ao longo das duas alfa-hélices e uma glicina na alça entre as hélices. O domínio R é rico em resíduos de aminoácidos polares sendo capaz de formar uma alfa-hélice hidrofílica. Para ser considerado uma proteína TCP é necessário a presença do domínio TCP (MARTÍN-TRILLO; CUBAS, 2010). Baseado nesta premissa, todas as sequências correspondiam a proteínas TCPs (Figura 1), sendo *FaTCP12* (57534,4 Da) a com maior peso molecular e *FaTCP13* (10699,9) a com menor peso molecular, enquanto o ponto isoelétrico variou de 4,7918 (*FaTCP3*) a 11,2265 (*FaTCP2*) (Tabela 1). Esses dados são importantes para realizar análises de proteômica, como a precipitação de proteínas; e biologia molecular, como a clonagem.

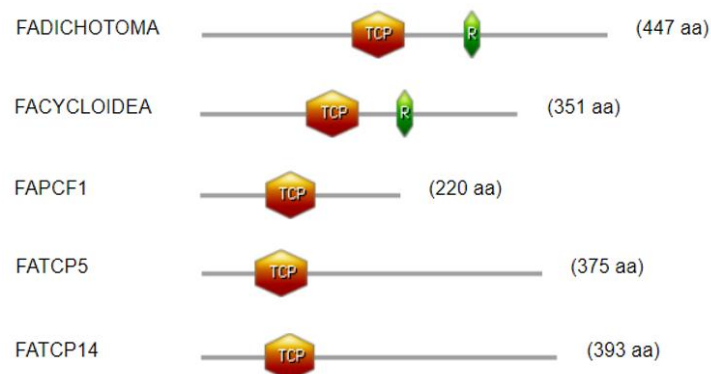


Figura 1 – Domínios proteicos presentes em *FaTCPs*

Fonte: elaborada pelo autor, 2021.

Os valores de peso molecular, ponto isoelétrico e quantidade de aminoácidos das isoformas de *FaTCP* são semelhantes aos identificados em TCPs de espécies como *Malus domestica* (Maçã), *Vitis vinífera* (Uva), *Gossypium hirsutum* (Algodão) e

F. vesca (Morango selvagem) (JIU *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2019). Entretanto, podemos observar no banco de FTs *PlantTFDB* (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) que a quantidade de integrantes dessa família de FTs pode variar significativamente. A espécie que mais possui TCPs de acordo com o banco é a *Nicotiana tabacum* (Tabaco) com 96 isoformas, enquanto a espécie *Saccharum officinarum* (Cana-de-açúcar) conta com apenas duas isoformas. É importante salientar que, outras cópias de TCP poderão ser identificadas em bancos de mRNAseq obtidos a partir de plantas de morango submetidas a diferentes condições, visto que o Plant TFDB realiza a predição a partir do genoma da planta, sem considerar a possibilidade de variantes provenientes de splicing alternativo. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de existência de outras cópias em genótipos de *F. ananassa* como consequência de mutações aleatórias.

As 15 isoformas da família das *FaTCP* possuem localização nuclear (Tabela 1) indicando um padrão típico de FTs, visto que estes regulam a transcrição de genes alvos através da ligação a cis elementos específicos em seus promotores e essa ligação, por sua vez, ocorre no núcleo. No entanto, a predição realizada pelo preditor DeepLoc apontou a possibilidade de localização citoplasmática da proteína *FaTCP3*, este FT foi relacionado à biossíntese de flavonóides em *Arabidopsis thaliana*. Através de um ensaio Y2H, foi demonstrado que a *AtTCP3* pode formar um complexo com proteínas R2R3-MYB que ativa os genes necessários para a biossíntese de flavonóides (LI; ZACHGO, 2013).

Tabela 1 – Características das isoformas da família *FaTCP*.

Gene	CDS (nt)	PM	pl	aa	Localização Celular	Probabilidade
<i>FaTCP1</i>	289	10882,1 Da	10,7452	96	Núcleo	0,9666
<i>FaTCP2</i>	361	13124,8 Da	11,2265	120	Núcleo	0,9971
<i>FaTCP3</i>	332	11796,1 Da	4,7918	109	Núcleo Citoplasma	0,5391 0,4063
<i>FaTCP4</i>	954	33037,2 Da	7,9127	317	Núcleo	0,9962
<i>FaTCP5</i>	663	24092,6 Da	8,4067	220	Núcleo	0,9898
<i>FaTCP6</i>	1050	39411,3 Da	10,7765	349	Núcleo	0,9386
<i>FaTCP7</i>	1344	50327,7 Da	6,8793	447	Núcleo	0,9996
<i>FaTCP8</i>	783	28026,9 Da	9,0438	260	Núcleo	0,9993
<i>FaTCP9</i>	1269	45235,5 Da	7,2598	422	Núcleo	0,921
<i>FaTCP10</i>	1182	41701,8 Da	7,952	393	Núcleo	0,8603
<i>FaTCP11</i>	1128	41477,2 Da	9,0286	375	Núcleo	0,8987
<i>FaTCP12</i>	1596	57534,4 Da	10,1545	531	Núcleo	0,8534
<i>FaTCP13</i>	309	10699,9 Da	7,4205	103	Núcleo	0,8815
<i>FaTCP14</i>	1056	39151,1 Da	8,9351	351	Núcleo	0,9993
<i>FaTCP15</i>	1507	53108,7 da	8,3545	501	Núcleo	0,9971

CDS – Sequência Codificadora; PM – Peso Molecular; pl – Ponto Isoelétrico; aa – aminoácidos.
Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

4.2 Motivos proteicos presentes em *FaTCP*.

Quanto à presença de motivos proteicos, em *Fragaria x vesca* existem quatro motivos conservados que podem estar presentes nas isoformas da família das TCPs, são eles o motivo um, que se localiza no domínio TCP; o motivo dois, localizado na região N-terminal; o motivo três, localizado na região C-terminal; e o motivo quatro, chamado de R (WEI *et al.*, 2016). No entanto, nesse estudo com *Fragaria x ananassa* identificamos em sete isoformas (*FaTCP4*, *FaTCP5*, *FaTCP8*, *FaTCP9*, *FaTCP10*, *FaTCP13* e *FaTCP15*) a existência de apenas três dos motivos presentes em seu ancestral diplóide, enquanto seis isoformas (*FaTCP3*, *FaTCP6*, *FaTCP7*, *FaTCP11*, *FaTCP12* e *FaTCP14*) apresentam apenas dois motivos característicos, o que sugere eventos de deleção nessas sequências a partir da sequência ancestral.

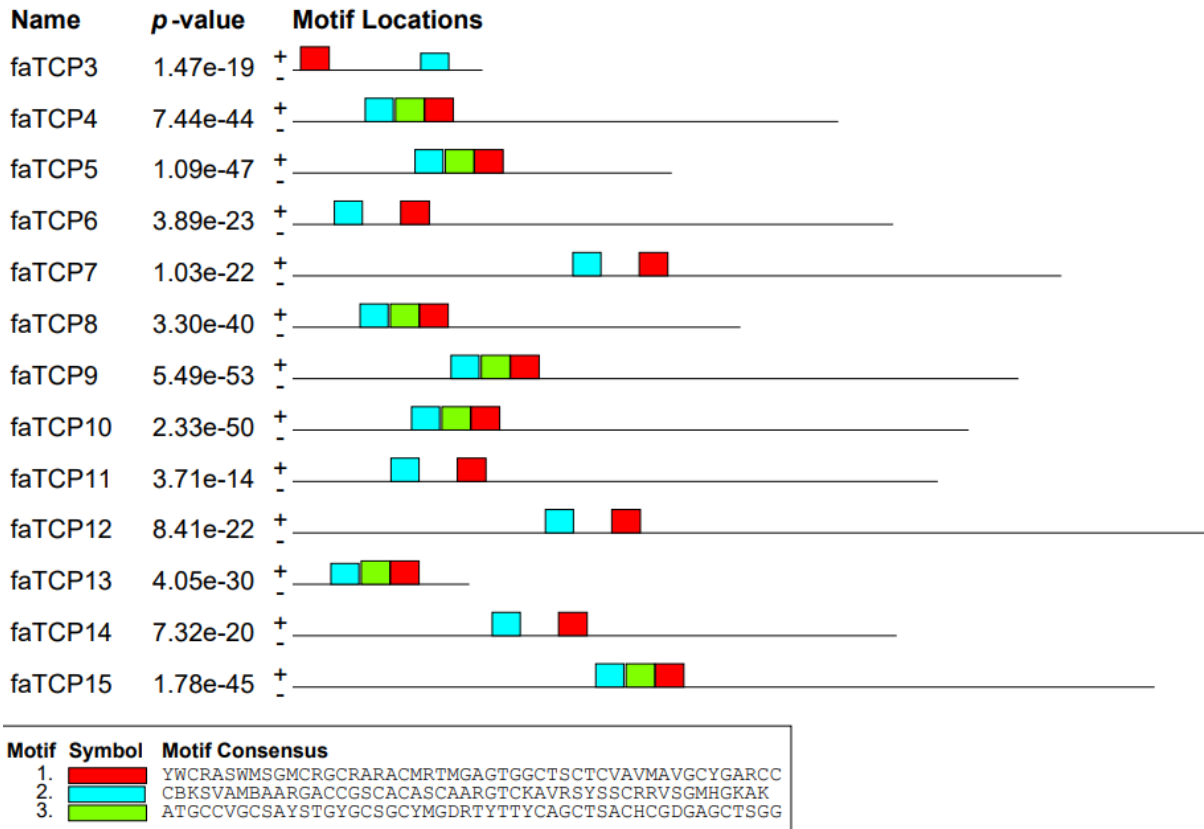


Figura 2 – Motivos proteicos presentes em *Fa*TCP.
 Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

4.3 Análise Filogenética de TCP

Análises filogenéticas permitem traçar um paralelo com isoformas de espécies distintas, possibilitando supor que as mais próximas possam atuar no mesmo contexto daquelas em que a função foi descrita anteriormente na literatura. Por este motivo, esta análise foi realizada utilizando as sequências de *Fa*TCPs identificadas, juntamente com sequências previamente descritas para as espécies *Fragaria vesca* e *Arabidopsis thaliana* (Figura 2). A árvore filogenética obtida foi colorida conforme sua topologia, para facilitar a visualização da mesma e dividida em dois grandes grupos de acordo o trabalho de Wei W (Wei *et al.* 2016), sendo eles, A nas cores vermelho e azul, e B na cor rosa. Como é possível observar na Figura 2, cinco sequências de *Fa*TCP pertencem ao grupo A e nove ao grupo B. Foi possível observar a divisão das TCPs em clados que representam os diferentes subgrupos em que os membros dessa família são classificados: CYC/TB1 colorido em vermelho; CIN colorido em azul e PCF colorido em rosa. Dentre os membros do subgrupo CYC/TB1 estão a *Fv*TCP18; *Fa*TCP18, *At*TCP18, *Fv*DICHOTOMA, *Fa*DICHOTOMA, *Fv*CYCLOIDEA e

FaCYCLOIDEA. Entre os membros do subgrupo CIN estão presentes as FvTCP4, FaTCP4-2, AtTCP4, FvTCP5, FaTCP5 entre outras; enquanto o subgrupo PCF concentra grande parte das sequências, como a FvTCP8, FaTCP8, AtTCP8, FvTCP20, FaTCP20, AtTCP20 entre outras.

Em *F. vesca*, um estudo demonstrou que a FvTCP9 promove o processo de maturação através da regulação da biosíntese de ABA e antocianinas (XIE *et al.*, 2020b). De acordo com a árvore filogenética a FaTCP9 é a isoforma que se encontra mais próxima da FvTCP9, sugerindo que a função de ambas possa ser similar. O perfil de expressão das 18 FvTCP foi analisado no desenvolvimento floral e no desenvolvimento do fruto, onde foi possível observar uma diferença entre as isoformas (ZHENG *et al.* 2019). FvTCP13, FvTCP5-like, FvTCP18, FvTCP8 e FvPCF1 são mais expressas durante o desenvolvimento do fruto e as isoformas de FaTCP mais próximas segundo a análise filogenética são: FaTCP5, FaTCP18, FaTCP8 e FaPCF1 respectivamente. As FvTCPDICHOTOMA, FvTCP7 e FvCYCLOIDEA são mais expressas nas flores, sendo que as isoformas de FaTCP mais próximas na análise filogenética são FaDICHOTOMA, FaTCP7 e FaCYCLOIDEA respectivamente.

A AtTCP3 forma complexos proteicos com a R2R3-MYB e promove a síntese de flavonoides (LI; ZACHGO, 2013), um grupo de metabólitos secundários, do qual fazem parte as antocianinas, pigmentos solúveis presentes no morango, responsáveis por sua coloração avermelhada nos estádios finais de amadurecimento. As FaTCP mais próximas de AtTCP3 são as FaTCP5-like e FaTCP4 que podem apresentar funções similares. A AtTCP15 atua como uma moduladora da biossíntese de antocianinas em condições de alta luminosidade, visto que a oxidação de um resíduo de cisteína no domínio TCP inibe sua atuação e conseqüentemente aumenta a síntese dessas moléculas antioxidantes nesta condição (VIOLA; CAMOIRANO; GONZALEZ, 2016). Na árvore filogenética, podemos observar que as sequências mais próximas da AtTCP15 são as FaPCF1 e FvPCF1 e no estudo citado anteriormente, foi verificado uma possível atuação da FvPCF1 no desenvolvimento do receptáculo floral, devido a sua elevada expressão nesse órgão, sugerindo que FaPCF1 possa exercer função similar.

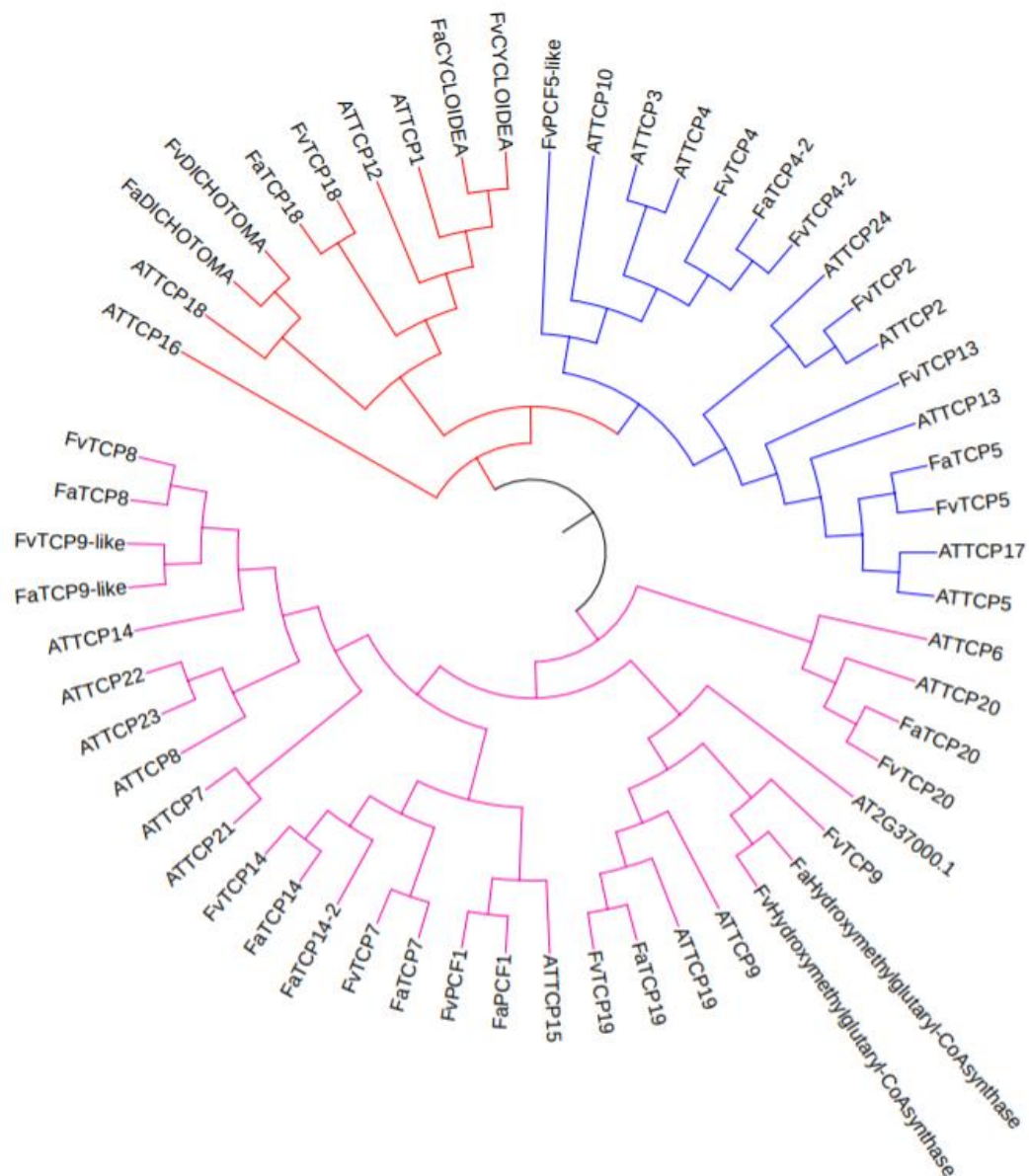


Figura 3 – Análise filogenética de genes TCP de morango. As sequências de nucleotídeos dos genes TCP em *F. ananassa*, *F. vesca* e *A. thaliana* foram alinhadas usando ClustalX, e a árvore filogenética foi construída através do método *neighbor-joining* com 500 réplicas de *bootstrap*, utilizando a ferramenta *Mega*. Os ramos da árvore foram coloridos para indicar os diferentes subgrupos formados. Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

4.4 Rede de interação entre TCPs

Os genes TCP, estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos ao longo do ciclo de vida de um organismo vegetal, dentre eles, o desenvolvimento de órgãos e respostas a estresses bióticos e abióticos. As redes de interações obtidas através da construção do interatoma com proteínas homólogas de FaTCP, evidenciaram a relação com uma grande diversidade de proteínas, principalmente

outros FTs. As TCPs possuem um motivo alfa-hélice localizado na segunda hélice do domínio TCP e membros da classe 2 da família TCP possuem um domínio R rico em arginina, ambos responsáveis por interações proteicas (CUBAS; LAUTER; DOEBLEY, 1999; LI; GUTSCHE; ZACHGO, 2011). Essas características estruturais das proteínas TCP, permitem a formação de complexos com outras proteínas, aumentando sua gama de atuação.

No total, 18 FTs foram revelados pela rede de interação, sendo 4 deles associados com estresses abióticos, STOP1 (Sensível a rizotoxicidade de prótons 1), TFbHLH47 (Fator de transcrição hélice-loop-hélice básica 47), RZ1B (Ribonucleoproteína heterogênea RZ1B) e VOZ1 (Planta vascular um-dedo de zinco 1). STOP1, é um FT do tipo dedos de zinco, que participa do processo de adaptação da planta em meios com elevada concentração de alumínio, um metal capaz de conferir toxicidade através da acidificação do solo. *Arabidopsis thaliana* que sofreram um processo de mutação na região da STOP1 responsável por sua ligação ao DNA, apresentaram um aumento na sensibilidade ao Al^{3+} . O transcriptoma dessas plantas mutantes revelou uma queda na expressão de diferentes genes, dentre eles, AtALMT1 (Transportador de malato ativado com alumínio) e AtALS3 (Alumínio-sensível 3), explicando a alta sensibilidade ao Al^{3+} pelas plantas mutantes, visto que esses genes são importante na adaptação ao aumento na concentração desse metal (SAWAKI et al., 2009). Os bHLH formam uma superfamília de FTs e estão associados com o desenvolvimento vegetal e adaptação em condições de estresse. Foi observado o padrão de expressão de bHLHs em *Triticum aestivum* (trigo) sob condições de alta e baixa temperatura e estresse hídrico e salino, para tal, foi utilizado dados de RNA-seq. Os níveis de expressão de 159 genes TabHLH apresentaram alterações, sendo que, 98,7% deles foram afetados por mais de um estresse, 47,8% dos genes tiveram sua expressão aumentada em relação ao estresse salino (WANG et al., 2019). Os TFbHLH são capazes de formar complexos proteicos com outros FTs, como o complexo regulatório MYB-bHLH-WD40 responsável por regular a biossíntese de antocianinas em *Vaccinium corymbosum* (Amora) (ZHAO et al., 2019). Esse mesmo complexo MYB-bHLH-WD40, está envolvido no controle da biossíntese de proantocianinas em frutos de *F. ananassa* (SCHAART et al., 2013).

Os FTs RZ-1, são uma família que pertencem ao grupo dos FTs dedos de zinco. As proteínas RZ1B apresentam ligação não específica com sequências de RNA, ao contrário da RZ1A que se liga preferencialmente em regiões ricas em guanina e

uracila. Essas proteínas atuam como chaperonas em plantas sob condições de baixa temperatura. A introdução do gene *AtRZ1B* na cepa mutante, BX04 da bactéria *Escherichia coli*, uma cepa onde 4 proteínas de resistência ao frio foram removidas, conferiu resistência a condição de baixa temperatura (KIM et al., 2010). VOZ, é uma família de FTs que contém dois membros, VOZ1 e VOZ2, e atuam regulando a expressão de genes através da ligação com cis-elementos presentes em seus promotores. Essa família está relacionada com o progresso do florescimento em *Arabidopsis thaliana* através da regulação do fotorreceptor PhyB (fitocromo fotorreceptor B) (YASUI et al., 2012). Além disso, os genes VOZ regulam a expressão de diferentes famílias de FTs, como as bHLH, MYB e NAC, conforme os resultados da expressão gênica de plantas de *Arabidopsis thaliana* onde os genes VOZ foram superexpressos. Plantas de *Arabidopsis* que sofreram *knock-out* dos dois genes, VOZ1 e VOZ2, apresentaram alta sensibilidade ao estresse salino, enquanto nas plantas onde os mesmos genes foram superexpressos, 9 genes relacionados com a resposta a esse estresse apresentaram um aumento em sua expressão, (LTP4, AKR4c8, ZAT12, COR13, VSP2, At1g10585 (bHLH), At1g16850, ATTI1 e ATCAD8) o que resultou em plantas mais resistentes a essa condição (PRASAD; XING; REDDY, 2018).

Além da presença de FTs, a rede de interação evidenciou proteínas associadas com a biossíntese de carotenoides e dos fitormônios ABA, estringolactonas e giberelina. A enzima prolicopeno isomerase (CRTISO) participa da biossíntese de carotenoides através da sua atividade cis-trans-isomerase, que realiza a conversão da molécula 7,9,9'-tri-cis-neurosporeno para 9'-cis-neurosporeno e 7,7',9,9'-tetra-cis-licopeno em all-trans-licopeno, conhecida como prolicopeno. CRTISO está envolvida na via de biossíntese de licopeno, que faz parte da via de biossíntese de carotenoides (PARK et al., 2002). Outra enzima envolvida na biossíntese de carotenoides apresentada pelas redes de interações, é a CCD8 (Dioxigenase de clivagem de carotenoides 8) que participa do processo catabólico do betacaroteno em carlactona, uma molécula da classe das estringolactonas, que possui atividade hormonal e está relacionada a inibição do perfilhamento e ramificação do caule, também regulam a arquitetura do caule em condições de escassez de fosfato. Além da CCD8, a enzima D27 (betacaroteno isomerase D27) presente na rede, também participa do processo de biossíntese de estringolactonas através isomerização da molécula all-trans- β -

caroteno em 9-cis- β -caroteno, substrato da enzima CCD7 (Dioxigenase de clivagem de carotenoides 7) (ALDER *et al.*, 2012).

O gene ABA3, codifica para a proteína Cofator sulfurase de molibdênio. A reação de sulfatação do molibdênio é fundamental para o funcionamento das enzimas XDH (Xantina desidrogenase) e ADO (Aldeído oxidase) nas quais o cofator se liga através de um átomo de oxigênio e um átomo de enxofre. ABA3 participa da biossíntese de ABA como um regulador chave, participando dos processos de adaptação a baixas temperaturas, estresses osmóticos e possivelmente maturação de frutos não-climatéricos, visto que o ABA desempenha papel importante na maturação dessa classe de frutos (XIONG *et al.*, 2001). A proteína Giberelina 2-beta-diozigenase 2 codificada pelo gene GA2OX2, catalisa a 2-beta-hidroxilação de muitas moléculas de giberelinas, regulando os níveis endógenos desse fitormônio e consequentemente sua homeostase. As giberelinas formam um grande grupo de ácidos carboxílicos diterpenóides tetracíclicos onde alguns membros atuam como reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal (THOMAS; PHILLIPS; HEDDEN, 1999).

Três membros da família CYP450 (Citocromo P450) foram exibidos pela análise de interação, CYP97C1, CYP716B1, CYP711A1. Duas delas, CYP97C1 e CYP711A1 estão envolvidas na biossíntese de carotenoides, a primeira atua na hidroxilação do alfa-carotenoide e a última converte a carlactona em ácido carlactonoico, atuando a jusante da CCD7 e CCD8 na via das estringolactonas (BOOKER *et al.*, 2005; FIORE *et al.*, 2006).

As demais proteínas que surgiram nas redes de interações não foram abordadas durante a discussão, isto se deve ao fato delas não estarem relacionadas diretamente com estresses abióticos e o amadurecimento de frutos, portanto, o enfoque foi dado aquelas que possuem relação com os tópicos abordados neste trabalho.

5 Conclusão

No presente estudo, a caracterização das 15 isoformas de FaTCP em morango possibilitou uma melhor compreensão sobre esta família gênica. As análises realizadas permitiram confirmar a identidade destas proteínas como TCPs, pela presença de domínios específicos, bem como, inferir relações filogenéticas e relacionar as TCPs de *F. ananassa*, com isoformas de outras espécies, onde o conhecimento da atuação dos membros dessa família encontra-se mais avançado, como as *FvTCP9*, *AfTCP15* e *AfTCP3*. E a análise de rede de interação entre proteínas evidenciou a relação com proteínas importantes no contexto de estresses abióticos e biossíntese de fitormônios, como as proteínas STOP1, TFbHLH47, RZ1B, VOZ1, CRTISO, CCD8, D27, ABA3, GA2OX2, CYP97C1, CYP716B1 e CYP711A1. Esses resultados contribuem para elaboração de técnicas biotecnológicas, que visem minimizar os efeitos negativos causados por estresses abióticos em plantas de morango, cooperando com o fortalecimento da cultura do morangueiro no Brasil.

A oportunidade de realizar meu estágio no grupo me proporcionou não apenas conhecer mais sobre as RBOHs e TCPs, como também desenvolver a habilidade de trabalho em equipe e entender a rotina de trabalho em ambiente laboratorial, além do mais, aprender sobre a cultura do morangueiro e seus desafios atualmente, como a susceptibilidade a estresses bióticos e abióticos que afetam negativamente a produção de frutos, impactando diretamente o produtor rural que depende dessa produção para seu sustento. Infelizmente devido a pandemia de Covid-19 na qual o Brasil se encontra, as atividades presenciais na Universidade Federal de Pelotas foram restritas apenas aos alunos de pós-graduação, e essa situação impossibilitou a realização de algumas análises planejadas para esse trabalho. Entretanto, isso não foi um impedimento total, graças a possibilidade de efetuar análises por meio da bioinformática, que nos permite trabalhar na segurança de nossas casas.

Referências

- AHMAD, P. et al. **Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress***Critical Reviews in Biotechnology*, set. 2010.
- ALDER, A. et al. The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. **Science**, v. 335, n. 6074, p. 1348–1351, 2012.
- BOOKER, J. et al. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. **Developmental Cell**, v. 8, n. 3, p. 443–449, 2005.
- BRESEGHELLO, F.; COELHO, A. S. G. Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 35, p. 8277–8286, 2013.
- CHALLA, K. R.; AGGARWAL, P.; NATH, U. Activation of YUCCA5 by the transcription factor TCP4 integrates developmental and environmental signals to promote hypocotyl elongation in arabidopsis. **Plant Cell**, v. 28, n. 9, p. 2117–2130, 2016.
- CHEN, Y. et al. **Ethylene receptors and related proteins in climacteric and non-climacteric fruits***Plant Science*Elsevier Ireland Ltd, , 1 nov. 2018.
- CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 419–423, 2002.
- CONTIGIANI, E. V. et al. Postharvest Quality of Strawberry Fruit (*Fragaria x Ananassa* Duch cv. Albion) as Affected by Ozone Washing: Fungal Spoilage, Mechanical Properties, and Structure. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 9, p. 1639–1650, 2018.
- CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLEY, J. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development - Cubas - 2002 - The Plant Journal - Wiley Online Library. **The Plant Journal**, v. 18, p. 215–222, 1999.
- DANISMAN, S. et al. Arabidopsis class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. **Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 1511–1523, ago. 2012.
- DAS GUPTA, M.; AGGARWAL, P.; NATH, U. CINCINNATA in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 901–912, 2014.
- DEINLEIN, U. et al. **Plant salt-tolerance mechanisms***Trends in Plant Science*Elsevier Ltd, , 2014.

- DIMEGLIO, L. M. et al. A phylogenetic analysis of the genus *Fragaria* (strawberry) using intron-containing sequence from the ADH-1 gene. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–12, 2014.
- EFRONI, I. et al. Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. **Developmental Cell**, v. 24, n. 4, p. 438–445, 2013.
- FENG, X. et al. Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 4970–4975, 2006.
- FILHO, J. E. R. V. EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA NO BRASIL: DESAFIOS E PERSPECTIVAS José Eustáquio Ribeiro Vieira Filho. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, v. 1, p. 36, 2016.
- FIORE, A. et al. Elucidation of the β -carotene hydroxylation pathway in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 580, n. 19, p. 4718–4722, 2006.
- FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. **Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes** *Annals of Botany* Oxford University Press, , 1 fev. 2015.
- FRANCINI, A.; SEBASTIANI, L. Abiotic stress effects on performance of horticultural crops. **Horticulturae**, v. 5, n. 4, 2019.
- GHEYI, H.; DIAS, N. D. S.; LACERDA, C. DE. **Livro - Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. [s.l: s.n.].
- GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.
- GRANT C KRAMER et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective.pdf (application/pdf Object). **BMC Plant Biology**, v. 11:163, 2011.
- HAMMANI, K. et al. An *Arabidopsis* dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. **Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 730–740, 2011.
- JIA, H.-F. et al. Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. **Source: Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 188–199, 2011.
- JIU, S. et al. Genome-Wide Identification, Characterization, and Transcript Analysis of the TCP Transcription Factors in *Vitis vinifera*. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. December, 2019.
- KIM, W. Y. et al. Comparative analysis of *Arabidopsis* zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding proteins during cold adaptation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 10–11, p. 866–872, 2010.

KOSUGI, S.; OHASHI, Y. **PCF1 and PCF2 Specifically Bind to cis Elements in the Rice Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene**. [s.l.] American Society of Plant Physiologists, 1997.

LEI, N. et al. Phylogeny and expression pattern analysis of TCP transcription factors in cassava seedlings exposed to cold and/or drought stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

LI, C. et al. **Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: A model for non-climacteric fruit ripening**. **Plant Signaling and Behavior**, 2011.

LI, S.; GUTSCHE, N.; ZACHGO, S. The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 2056–2068, 2011.

LI, S.; ZACHGO, S. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 76, n. 6, p. 901–913, 2013.

LI, W. et al. Genome-wide identification and characterization of TCP transcription factor genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

LI, W. et al. Overexpression of TCP transcription factor OsPCF7 improves agronomic trait in rice. **Molecular Breeding**, v. 40, n. 5, 2020.

LING, L. et al. Genome-wide analysis of the TCP transcription factor genes in five legume genomes and their response to salt and drought stresses. **Functional and Integrative Genomics**, v. 20, n. 4, p. 537–550, 2020.

LINKIES, A.; LEUBNER-METZGER, G. **Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination**. **Plant Cell Reports**, fev. 2012.

LISTON, A.; CRONN, R.; ASHMAN, T. L. *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 10, p. 1686–1699, 2014.

LIU, H. et al. TCP10, a TCP transcription factor in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), confers drought tolerance to transgenic plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 172, n. April 2019, p. 104002, 2020.

LIU, M. M. et al. Evolutionary and comparative expression analyses of TCP transcription factor gene family in land plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 1–24, 2019.

MARTÍN-TRILLO, M.; CUBAS, P. TCP genes: a family snapshot ten years later. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 1, p. 31–39, 2010.

- MUKHOPADHYAY, P.; TYAGI, A. K. OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.
- NATH, U. et al. Genetic control of surface curvature. **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1404–1407, 2003.
- NAVAUD, O. et al. TCP transcription factors predate the emergence of land plants. **Journal of Molecular Evolution**, v. 65, n. 1, p. 23–33, jul. 2007.
- OBANDO-ULLOA, J. M. et al. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit. 1. Aroma volatiles. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 27–37, jul. 2008.
- OSAKABE, Y. et al. **Sensing the environment: Key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress** **Journal of Experimental Botany**, jan. 2013.
- PARAPUNOVA, V. et al. Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2014.
- PARK, H. et al. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. **Plant Cell**, v. 14, n. 2, p. 321–332, 2002.
- PECHER, P. et al. Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of Arabidopsis versus maize. **bioRxiv**, p. 1–27, 2019.
- PRASAD, K. V. S. K.; XING, D.; REDDY, A. S. N. Vascular plant one-zinc-finger (VOZ) transcription factors are positive regulators of salt tolerance in arabidopsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. **Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants** **Plant Signaling and Behavior**, nov. 2011.
- ROHRMANN, J. et al. Combined transcription factor profiling, microarray analysis and metabolite profiling reveals the transcriptional control of metabolic shifts occurring during tomato fruit development. **Plant Journal**, v. 68, n. 6, p. 999–1013, 2011.
- RUDD, J. J.; FRANKLIN-TONG, V. E. **Calcium signaling in plants** **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** [s.l: s.n.].
- SAWAKI, Y. et al. Stop1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 281–294, 2009.
- SCHAART, J. G. et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 454–467, 2013.

SEWELAM, N. et al. A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: A genome-wide study. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 9, p. 2024–2035, 2014.

SONG, C. B. et al. Heterodimerization of MaTCP proteins modulates the transcription of MaXTH10/11 genes during banana fruit ripening. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1861, n. 7, p. 613–622, 2018.

SUN, J. et al. Pif4-mediated activation of yucca8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 3, 2012.

TAO, J. J. et al. The role of ethylene in plants under salinity stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. NOVEMBER, p. 1–12, 2015.

TATEMATSU, K. et al. Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 53, n. 1, p. 42–52, 2008.

THOMAS, S. G.; PHILLIPS, A. L.; HEDDEN, P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4698–4703, 1999.

TRIPATHY, B. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 12, 2012.

UBERTI MANASSERO, N. G. et al. TCP transcription factors: Architectures of plant form. **Biomolecular Concepts**, v. 4, n. 2, p. 111–127, 2013.

VIOLA, I. L. et al. Determinants of the DNA binding specificity of class I and class II TCP transcription factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 347–356, 2 jan. 2012.

VIOLA, I. L.; CAMOIRANO, A.; GONZALEZ, D. H. Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *arabidopsis1*[OPEN]. **Plant Physiology**, v. 170, n. 1, p. 74–85, 2016.

WANG, H. et al. The control of red colour by a family of MYB transcription factors in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 5, p. 1169–1184, 2020.

WANG, L. et al. Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). **3 Biotech**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2019.

WANG, X. Q.; RAN, J. H. **Evolution and biogeography of gymnosperms** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, jun. 2014.

WEI, W. et al. Identification and transcript analysis of the TCP transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. DECEMBER2016, p. 1–18, 2016.

XIANG, Y. et al. Evolution of Rosaceae Fruit Types Based on Nuclear Phylogeny in the Context of Geological Times and Genome Duplication. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 2, p. 262–281, 1 fev. 2017.

XIE, Y. G. et al. Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 374–383, 2020a.

XIE, Y. G. et al. Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, n. October 2019, p. 374–383, 2020b.

XIONG, L. et al. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. **Plant Cell**, v. 13, n. 9, p. 2063–2083, 2001.

XU, R. et al. Genomewide analysis of TCP transcription factor gene family in *Malus domestica*. **Journal of Genetics**, v. 93, n. 3, p. 733–746, 2014.

YANG, Y.; GUO, Y. **Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses** *New Phytologist* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2018.

YASUI, Y. et al. The phytochrome-interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3248–3263, 2012.

ZHANG, J. L.; FLOWERS, T. J.; WANG, S. M. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. **Plant and Soil**, v. 326, n. 1, p. 45–60, jan. 2010.

ZHAO, M. et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complex members controlling anthocyanidin biosynthesis in blueberry fruits development. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 1–11, 2019.