

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE TCP's EM FRAGARIA X ANANASSA

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO¹; ROSANE LOPES CRIZEL²;
AUDREY CRISTINA DO NASCIMENTO³; VANESSA GALLI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel1@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – audreycn97@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

O morango, é um pseudofruto resultante do desenvolvimento do receptáculo floral e que apresenta um alto teor de compostos antioxidantes benéficos a saúde humana, como o ácido ascórbico (vitamina C) e as antocianinas, pigmentos solúveis responsáveis por sua coloração avermelhada nos estádios mais avançados da maturação. O Brasil ocupa a décima terceira posição no ranking de principais produtores de morango no mundo (FAOSTAT) com uma produção estimada em 165,000 toneladas ao ano em 4,500 hectares.

Um dos problemas enfrentados em sua produção é à alta perecibilidade do fruto, pois precisa ser colhido maduro, fase em que sua resistência mecânica é baixa, ocasionando maiores perdas pós-colheita. Isso ocorre em consequência do morango ser um fruto não climatérico, onde à atuação do hormônio etileno e aumento na respiração não é significativo como nos frutos climatéricos como a banana e o tomate, que podem ser colhidos nos estádios anteriores a completa maturação, na qual sua resistência a danos físicos é maior. Isso evidencia um mecanismo diferente de amadurecimento pelo qual os frutos não climatéricos estão sujeitos, porém o mesmo ainda é pouco elucidado (Cherian et al. 2014).

O processo de maturação do morango, é caracterizado por uma série de alterações fisiológicas, como degradação da parede celular e clorofila e aumento nos teores de antocianinas e sacarose (Jia et al. 2011). Essas modificações acontecem durante o amadurecimento e são coordenadas por diferentes proteínas capazes de se ligar ao DNA. Tais proteínas são classificadas como fatores de transcrição, e operam unindo a RNA polimerase a uma sequências específica de DNA, resultando num bloqueio ou ativação de genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento do receptáculo floral (Seymour et al. 2010).

As TCPs são uma família de fatores de transcrição caracterizada pela presença de uma região conservada bHLH (basic helix-loop-helix) responsável por sua ligação ao segmento de DNA e domínios proteicos como 2Fe-2S ferredoxin, tiolase, EGF e VWFC (Fator Von Willebrand de tipo C) (Danisman 2016). Tais proteínas, estão presentes apenas em plantas vasculares e suas isoformas apresentam diferentes funções, em *Fragaria x vesca* por exemplo, a FvTCP9 regula a biosíntese de ácido abscísico (ABA) um importante hormônio vegetal capaz de promover a maturação dos frutos, visto que, o silenciamento gênico da enzima chave da biosíntese de ABA acarreta em frutos sem a coloração avermelhada característica dos frutos maduros (Xie et al. 2019).

Dessa forma, identificar as funções dos membros dessa família protéica se mostra importante pois o mecanismo de maturação dos frutos não-climatéricos é um processo fisiológico complexo que envolve a atuação de diferentes fatores de transcrição capazes de ativar ou inibir rotas bioquímicas do desenvolvimento e senescência do fruto. A construção de uma árvore filogenética é uma análise pertinente na busca pela função de genes ontólogos. Sendo assim, o presente

estudo busca correlacionar as sequências de TCPs do organismo *Fragaria x ananassa* com as isoformas dessa família em seu ancestral selvagem *Fragaria x vesca* e *Arabidopsis thaliana* por ser um organismo modelo amplamente utilizado.

2. METODOLOGIA

As sequências gênicas correspondentes às diferentes isoformas de FaTCP, FvTCP e AtTCP, foram baixadas do banco de dados de fatores de transcrição vegetais Plant TFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) e reunidas em um arquivo FASTA. Em seguida, para realizar o alinhamento das sequências o arquivo foi submetido ao Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Posteriormente, o arquivo foi convertido em formato MEGA para possibilitar a construção da árvore filogenética através do programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) usando o método neighbor joining com um total de 500 bootstraps.

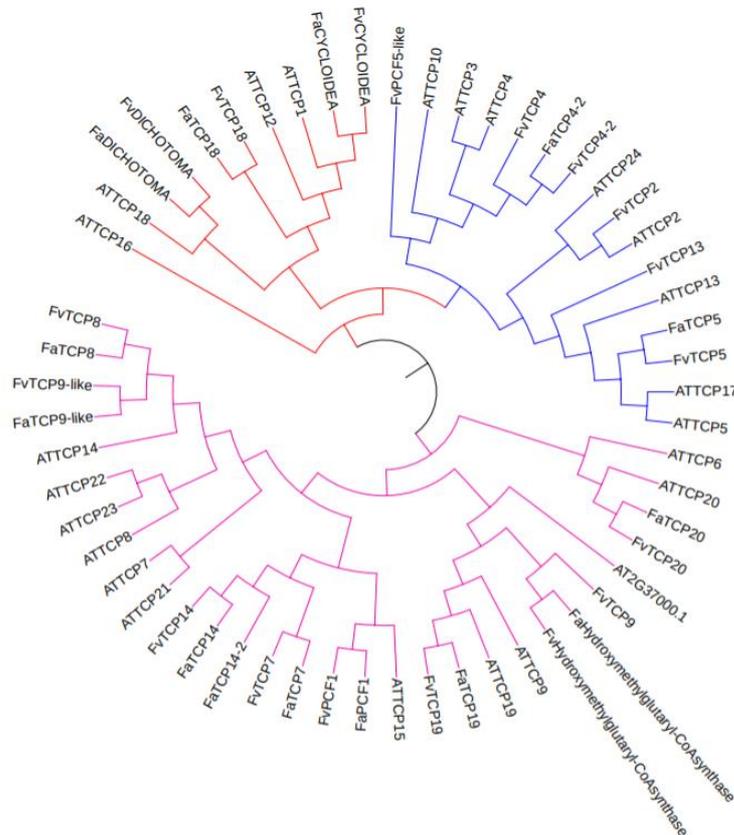
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A árvore 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. 5 sequências de FaTCP pertencem ao grupo A e 9 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 FvTCP18; FaTCP18; AtTCP18; FvDICHOTOMA; FaDICHOTOMA; FvCYCLOIDEA 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 *Fragaria vesca*, um estudo demonstrou que a FvTCP9 promove o processo de maturação através da regulação da biosíntese de ABA (ácido abscísico) e antocianinas (Xie et al. 2019). O perfil de expressão das 18 FvTCP foi analisado no desenvolvimento floral e também no desenvolvimento do fruto, onde foi possível observar uma diferença entre as isoformas, sendo as FvTCP13, FvTCP18, FvPCF5-like, FvTCP8 e FvPCF1 mais expressas durante o desenvolvimento do fruto, enquanto as FvTCPDICHOTOMA, FvTCP7, FvCYCLOIDEA entre outras, mais expressas nas flores (Zheng et al. 2019).

A atTCP3 forma complexos proteicos com a R2R3-MYB e promove a síntese de flavonóides (Li et al. 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 (Silva et al. 2005) e a AtTCP15 atua como uma moduladora da biosíntese de antocianinas em condições de alta luminosidade, visto que a oxidação de um resíduo de cisteína no domínio TCP inibe sua atuação e consequentemente aumenta a síntese dessas moléculas antioxidantes nesta condição (Viola et al. 2016). Na árvore filogenética, podemos observar que as sequências mais próxima 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.

Figura 1. Análise filogenética de proteínas TCP.



4. CONCLUSÕES

A importância desse estudo se dá por nortear futuras análises no organismo *Fragaria x ananassa*, pois a partir de pesquisas que evidenciem a função de determinada isoforma em diferentes contextos do crescimento e desenvolvimento vegetal é possível traçar um paralelo com a isoforma mais próxima em *Fragaria x ananassa*. Desse modo, é possível inferir que a isoforma de FvTCP e AtTCP mais próxima da isoforma em *Fragaria x ananassa*, pode exercer funções semelhantes no metabolismo, porém, é necessário validar essa hipótese por meio de técnicas como silenciamento gênico, em que a transcrição daquela proteína é bloqueada, resultando em uma alteração bioquímica e/ou fisiológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cherian, S., Figueroa, C. R., & Nair, H. (2014). "Movers and shakers" in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(17).
- Danisman, S. (2016). TCP Transcription Factors at the Interface between Environmental Challenges and the Plant's Growth Responses. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 374–382.
- FAOSTAT, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Dado de Cultivos. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>>
- Jia, A. H., Chai, Y., Li, C., Lu, D., Luo, J., Qin, L., ... September, N. (2014). Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening Yuan-Yue Shen Stable 157(1), 188–199.
- Li, S., & Zachgo, S. (2013). TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 76(6), 901–913.
- Seymour, G. B., Ryder, C. D., Cevik, V., Hammond, J. P., Popovich, A., King, G. J., Vebrellov, J., Giovannoni J. J., Manning, K. (2010). A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria xananassa Duch.*) fruit, a non-climacteric tissue*. *Journal of Experimental Botany*, 62(3).
- Viola, I. L., Camoirano, A., & Gonzalez, D. H. (2015). Redox-Dependent Modulation of Anthocyanin Biosynthesis by the TCP Transcription Factor TCP15 during Exposure to High Light Intensity Conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 170(1), 74–85.
- Xie, Y.-G., Ma, Y.-Y., Bi, P.-P., Wei, W., Liu, J., Hu, Y., ... Feng, J.-Y. (2019). Transcription factor *FvTCP9* promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Zheng, L., X. Zhou, Y. Ma and M. Guo. (2019). Genome-wide identification and characterization of TCP family genes associated with flower and fruit development in *Fragaria vesca*. *Pak. J. Bot.*, 51(2).