

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – FAEM
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA



Dissertação

Genômica estrutural e comparativa dos genes *CYP707A* de *Fragaria x ananassa* e ensaios para construção de vetores virais para silenciamento gênico

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Pelotas, 2020

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Genômica estrutural e comparativa dos genes *CYP707A* de *Fragaria x ananassa* e ensaios para construção de vetores virais para silenciamento gênico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa Galli

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G643g Gonzalez, Hugo Carlos Bolzon

Genômica estrutural e comparativa dos genes
CYP707A de *Fragaria x ananassa* e ensaios para
construção de vetores virais para silenciamento gênico /
Hugo Carlos Bolzon Gonzalez ; Vanessa Galli, orientadora.
— Pelotas, 2020.

101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de
Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,
2020.

1. Morango. 2. Fitohormônios. 3. 8'-hidroxilase. 4.
Maturação. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 664

Genômica estrutural e comparativa dos genes *CYP707A* de *Fragaria x ananassa* e ensaios para construção de vetores virais para silenciamento gênico

Data da Defesa: 05 de março de 2020.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Vanessa Galli (Orientadora)

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof^o. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof^aDra. Luciana Bicca Dode

Doutorado em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Isabel Lopes Vighi

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a luta por um mundo onde caibam todos. Ao sonho de uma sociedade bela, onde haja espaço para o indivíduo, pois já não restam dúvidas sobre o pertencimento de todos ao coletivo. Um mundo sem fome, sem exploração, sem guerra...

Dedico à realidade que tanto desejo que exista, para todos aqueles que amo, e a todos aqueles que poderei amar, quando o ódio resultante de individualismos mesquinhos não puder mais existir. Pois nossa visão de nós será inseparável do nosso entendimento de que somos uma espécie, em um planeta, com um infinito de possibilidades. Sem nenhuma das barreiras imaginárias que criamos para justificar a visão errônea de que não somos, no fundo, a mesma coisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao acaso, por tornar tudo possível.

Agradeço a minha mãe por jamais deixar que a distância me faça sentir só, desamparado ou não amado. Por lutar todos os dias, desde que eu tenho vida, para proporcionar uma vida digna, instigar minhas pontencialidade e auxiliar na transformação daquela criança que um dia eu fui, na pessoa que me torno. E a minha irmã, por ser a alegria viva da família, por serem Ohana, por sempre estarem aqui e por lutarem todos os dias uns pelos outros. *“Amo vocês da rua pra cima, e mais um pouco”*.

Agradeço aos meus amigos e meus companheiros de casa, de luta, em especial ao Murillo Neves (Muzi), com quem dividi tantas experiências e aprendizados.

Agradeço ao PPGCTA pela oportunidade, pelos aprendizados e pelas pessoas que pude conhecer. Por todo processo de transformação que o aprendizado trás.

Agradeço à minha orientadora prof^a Dra. Vanessa Galli, carinhosamente chamada de Mãe Vanessa. Por acreditar em mim e ajudar a mover todas as pedras que o caminho trouxe. Por ver o mundo de uma maneira bela e construir uma realidade ainda melhor todos os dias. Se 10% das pessoas que dedicam suas vidas ao ensino e ao conhecimento fossem como você, professora, o mundo já seria um lugar muito, mas muito melhor. Obrigado por tudo. Gratidão e admiração por ti já tenho de sobra.

Agradeço ao professor Dr. César Valmor Rombaldi, por me fazer acreditar na docência, no poder transformador do conhecimento e na capacidade humana, para construir e destruir. Obrigado por todas as reflexões, todas as palavras de incentivo e todos os desafios. Você e a professora Vanessa são pilares fundamentais de quem sou agora e do indivíduo que virei a ser. Obrigado por tudo. Jamais esquecerei.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, à toda a equipe e ao companheirismo em todas as etapas destes últimos ciclos. Confio no potencial de todos vocês e agradeço a oportunidade de partilhar desses aprendizados e vivências.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

Meu muito obrigado.

“[...] Nuestra época es portentosamente revolucionaria como no ha conocido la historia de la humanidad. Pero no tiene conducción consciente, o menos, conducción simplemente instintiva. Mucho menos todavía, conducción política organizada porque ni siquiera hemos tenido filosofía precursora [...]”

“[...] necesitamos gobernarnos a nosotros mismos o sucumbiremos [...]”

“[...] Este es nuestro dilema. No nos entretengamos solos remendando consecuencias. Pensemos en las causas de fondo, en la civilización del despilfarro, en la civilización del use-tire que lo que está tirando es tiempo de vida humana malgastado, derrochando cuestiones inútiles. Piensen que la vida humana es un milagro. Que estamos vivos por milagro y nada vale más que la vida. Y que nuestro deber biológico es por encima de todas las cosas respetar la vida e impulsarla, cuidarla, procrearla y entender que la especie es nuestro nosotros. ” - José Alberto Mujica Cordano - LXVIII Período de Sesiones de la Asamblea General de la ONU - 2013

*“Eu sou tu, tu é eu também...
Nós é vós, vosmicê é também
O que quero, tu queres, meu bem
Somos um olho só, veja além...”
– Universo em Verso Livre*

RESUMO

GONZALEZ, Hugo Carlos Bolzon. **Genômica estrutural e comparativa dos genes *CYP707A* de *Fragaria x ananassa* e ensaios para construção de vetores virais para silenciamento gênico.** 2020. 101f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que cumpre diversos papéis no desenvolvimento das plantas. Está associado à resposta dos organismos aos estresses bióticos e abióticos, além de influenciar processos fisiológicos como o amadurecimento de frutos, em especial naqueles classificados com não climatéricos. Das vias metabólicas associadas ao ABA, a síntese de novo e a inativação reversível são as mais bem descritas na literatura, enquanto a degradação promovida pelas enzimas Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase, codificadas pelos genes da família gênica *CYP707A*, ainda é pouco elucidada. Diversos estudos apontam uma variedade de funções e respostas associadas aos diferentes genes *CYP707A* e da possibilidade da utilização dos mesmos como alvos biotecnológicos na obtenção de culturas engenheiradas que propiciem melhora na resposta fisiológica da planta ou ainda no direcionamento de processos metabólicos. O Morango tem sido utilizado como modelo de estudo do processo de maturação dos frutos não climatéricos e da resposta ao estresse abiótico, porém os genes *CYP707A* da espécie não estão totalmente descritos e carecem de caracterização. Nessa perspectiva, sequências *CYP707A* identificadas em transcriptoma de frutos de morango foram utilizadas neste trabalho visando a melhor caracterização *in silico* das sequências, através de análises de genômica estrutural e comparativa, auxiliando a construir uma plataforma de silenciamento gênico induzido por vírus a ser utilizado no estudo do efeito dos genes *CYP707A* no desenvolvimento do morango. Foram observados os alinhamentos entre as sequências e a presença de homólogos em banco de dados Genômico disponibilizado para a espécie, com a caracterização de grupamentos funcionais, peptídeos sinais e filogenia das mesmas, corroborando com a validação da existência das cópias, e de suas diferenciações evolutivas, fortalecendo o entendimento dos papéis tecido-específicos das diferentes cópias gênicas nos processos fisiológicos da planta. Ainda foi obtido o interatoma das sequências com maior homologia em banco de dados de *Fragaria vesca*, ampliando a confiabilidade da real existência das sequências e de seu papel no metabolismo do ABA e dos processos relacionados à maturação e a resistência aos estressores ambientais.

Palavras-chave: morango; fitohormônios; 8'-hidroxilase; maturação.

ABSTRACT

GONZALEZ, Hugo Carlos Bolzon. **Structural and comparative genomics of *Fragaria x ananassa* CYP707A genes and assays for the construction of viral vectors for gene silencing.** 2020. 101f. Dissertation (Master Degree in Food Science and Technology) – Graduate Program in Food Science and Technology, School of Agronomy “Eliseu Maciel”, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Absciscic acid (ABA) is a plant hormone that plays several roles in plant development. It is associated with the response of organisms to biotic and abiotic stresses, besides influencing physiological processes such as fruit ripening, especially in those classified as non-climacteric. On the metabolic pathways associated with ABA, de novo synthesis and reversible inactivation are the best described in the literature, while the degradation promoted by the enzymes Absciscic Acid 8'-Hydroxylase, encoded by the genes of the CYP707A gene family, is still poorly elucidated. Several studies suggest a variety of functions and responses associated with different CYP707A genes and the possibility of using them as biotechnological targets in obtaining engineered cultures that provide an improvement in the physiological response of the plant or in directing metabolic processes. Strawberry has been used as a model to study the maturation process of non-climacteric fruits, as well in the response to abiotic stress, however, the species' CYP707A genes are not fully described and need to be characterized. In this perspective, CYP707A sequences identified in strawberry fruit transcriptome were used in this work aiming to build a better in silico characterization of the sequences, through structural and comparative genomics analyzes, helping to build a virus-induced gene silencing platform to be used in the study of the effect of CYP707A genes on strawberry development. The alignments between the sequences and the presence of homologues were observed in a Genomic database available for the species, with the characterization of functional groups, signal peptides and their phylogeny, corroborating with the validation of the existence of the copies, and their evolutionary differentiations, strengthening the understanding of the tissue-specific roles of different gene copies in the plant's physiological processes. The interatoma of the sequences with greater homology was also obtained in the database of *Fragaria vesca*, increasing the reliability of the real existence of the sequences and their role in ABA metabolism and processes related to maturation and resistance to environmental stressors.

Keywords: Strawberry; phytohormone; 8'-hydroxylase; ripening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das rotas metabólicas de síntese <i>de novo</i> , inativação por glicosilação e inativação irreversível do ácido abscísico	20
Figura 2 Esquema representativo do silenciamento gênico induzido por vetor viral e agroinoculação.....	28
Figura 3. Representação gráfica do alinhamento das sequências CYP707A de <i>Fragaria ananassa</i>	36
Figura 4. Representação gráfica da predição de peptídeo sinal em CYP707A1 através do SignalP 5.0.	37
Figura 5. Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A1 através do TargetP 2.0.	37
Figura 6. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A1. .	38
Figura 7. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A2, apresentando a sobreposição do domínio, apontando o possível erro de montagem. ..	38
Figura 8. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A3. .	38
Figura 9. Árvore filogenética construída com algoritmo ClustalW e método <i>Neighbor Joining</i>	40
Figura 10. Legenda e significados dos símbolos presentes no interatoma	41
Figura 11. Interatoma das sequências homólogas as CYP707A1-A2-A3 em <i>Fragaria vesca</i>	42
Figura 12. Representação do fragmento da sequência <i>CYP707A1</i> com seus primers e enzimas de restrição compatíveis com o vetor TRV2	44
Figura 13. Representação do fragmento da sequência <i>CYP707A</i> clonado no vetor TRV2.	46
Figura 14. Gel de agarose das tentativas de amplificação das sequências de interesse.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes utilizados na construção das árvores filogenéticas e seus identificadores.	30
Tabela 2. Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores ORFs	33
Tabela 3. <i>CYP707As</i> e os respectivos códigos identificadores das sequências afim no banco de dados de <i>Fragaria ananassa</i>	35
Tabela 4. <i>CYP707As</i> e os respectivos códigos identificadores e espécies das sequências mais próximas apresentadas nas montagens das árvores filogenéticas.....	39
Tabela 5. Primers <i>Forward (F)</i> e <i>Reverse (R)</i> para cada sequência <i>CYP707A</i> com as respectivas enzimas de restrição para clonagem no vetor TRV2.....	45

SUMÁRIO

SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 O morango.....	17
3.2 Ácido Abscísico – ABA	19
3.2.1 Rotas metabólicas	19
3.2.2 Síntese <i>de novo</i>	21
3.2.3 Glicosilação	23
3.2.4 Degradação oxidativa	24
3.3 CYP707A em morango.....	26
3.4 Silenciamento gênico por VIGS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Prospecção das sequências <i>CYP707A</i> no genoma de <i>Fragaria ananassa</i>	29
4.2 Alinhamento das sequências <i>CYP707A</i>	29
4.3 Domínios, peptídeo sinal e localização subcelular	29
4.4 Árvore filogenética.....	30
4.5 Interatoma	31
4.6 Montagem do vetor de silenciamento <i>in sílico</i> e obtenção de fragmentos <i>in vitro</i> 31	
4.6.1 <i>Primers</i> e fragmentos para silenciamento	31
4.6.2 Clonagem <i>in sílico</i>	32
4.6.3 Amplificação dos fragmentos <i>CYP707A</i>	32
5 RESULTADOS	32
5.1 Prospecção das sequências <i>CYP707A</i> no genoma de <i>Fragaria ananassa</i>	32
5.2 Alinhamento das sequências <i>CYP707A</i>	35
5.3 Domínios, peptídeo sinal e localização subcelular	36
5.4 Árvore Filogenética.....	39
5.5 Interatoma	41

5.6	Montagem do vetor de silenciamento <i>in silico</i> e obtenção de fragmentos <i>in vitro</i>	43
5.6.1	<i>Primers</i> e fragmentos para silenciamento	43
5.6.2	Clonagem <i>in silico</i>	46
5.6.3	Amplificação dos fragmentos de <i>CYP707A</i>	47
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9	ANEXOS.....	60
9.1	Sequências FASTA – <i>CYP707A Fragaria ananassa</i>	60
9.2	Alinhamento das sequências <i>CYP707A</i>	63
9.2.1	Alinhamento das sequências <i>CYP707A</i> base a base.....	63
9.2.2	Alinhamento das <i>CYP707A</i> (representação gráfica)	66
9.3	Alinhamento das <i>CYP707A</i> contra banco de dados genômico	67
9.3.1	Alinhamento da sequência <i>CYP707A1</i> com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.....	67
9.3.2	Alinhamento da sequência <i>CYP707A2</i> com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.....	72
9.3.3	Alinhamento da sequência <i>CYP707A3</i> com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.....	77
9.3.4	Alinhamento da sequência <i>CYP707A4</i> com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.....	82
9.4	Alinhamento das <i>CYP707A</i> com banco de dados genômico (representação gráfica).....	88
9.4.1	Alinhamento para <i>CYP707A1</i>	88
9.4.2	Alinhamento para <i>CYP707A2</i>	88
9.4.3	Alinhamento para <i>CYP707A3</i>	89
9.4.4	Alinhamento para <i>CYP707A4</i>	89
9.5	Peptídeo sinal, domínios e região transmembrana das sequências <i>CYP707A</i>	90
9.5.1	Peptídeo sinal	90
9.5.2	Região transmembrana	92

9.5.3	Domínios	94
9.6	Árvore filogenética.....	95
9.6.1	Alinhamento ClustalW – Método <i>Neighbor Joining</i>	95
9.6.2	Alinhamento ClustalW – Método <i>Maximum Likelihood</i>	96
9.6.3	Alinhamento ClustalW – Método <i>Minimum Evolution</i>	97
9.6.4	Alinhamento MUSCLE – Método <i>Neighbor Joining</i>	98
9.6.5	Alinhamento MUSCLE – Método <i>Maximum Likelihood</i>	99
9.6.6	Alinhamento MUSCLE – Método <i>Minimum Evolution</i>	100
9.7	Vetor TRV2 com MCS	101

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.) é um pseudofruto de importância econômica por empregar ampla mão de obra em seu cultivo, processamento e comercialização. Sua elevada procura está relacionada a suas características sensoriais como cor, aroma e sabor, além disso, é rico em compostos bioativos, com destaque para os compostos fenólicos e as antocianinas (GIAMPIERI et al., 2012).

Os aspectos sensoriais e biofuncionais do morango são influenciados pelo processo de maturação, para qual o morango é classificado como não climatérico. Embora este processo não esteja completamente caracterizado, estudos evidenciam que o fitormônio ácido abscísico (ABA) apresenta importante papel na sua regulação, indução da via metabólica de fenilpropanóides e no acúmulo de compostos antioxidantes (CHEN et al., 2016), apresentando variação em sua concentração especialmente durante a maturação de frutos (AYUB et al., 2016; LI et al., 2011). Demonstrou-se ainda que a aplicação exógena de ABA induz a produção de pigmentos associados à maturação, sendo uma possível estratégia de biofortificação da cultura (JIA et al., 2011).

Das rotas metabólicas do ABA, a síntese de novo promovida pelas enzimas NCED (9-cisepoxycarotenoid dioxigenase) é amplamente descrita, bem como a inativação reversível por glicosilação promovidas pelas enzimas BGs/GTs (β -glucosidases / UDP-glucosiltransferases). No entanto a rota de inativação irreversível promovida pelas enzimas CYP707A (Ácido Abscísico 8' – Hidroxilase 4) ainda é pouco elucidada. (HARTUNG et al., 2002; JIANG AND HARTUNG, 2007; SEO AND KOSHIBA, 2011).

Estudos sugerem que os diferentes genes *CYP707A* apresentam funções específicas no metabolismo vegetal, nos diferentes estádios de desenvolvimento, respondendo de modo diferente aos estímulos ambientais (KUSHIRO et al., 2004). Saito et al (2004) demonstrou que a regulação de *CYP707A* afeta o balanço dinâmico de ABA, bem como a perda de função de uma de suas cópias é capaz de afetar o nível de ABA em mudas. Ainda, é sabido que algumas cópias dos genes *CYP707A* são reguladas positivamente em caso de estresse e tratamento de ABA (ZHU et al., 2011; REN et al., 2010).

Em morango, quatro prováveis sequências *CYP707A* foram identificadas, porém três delas carecem de validação. A correta caracterização e validação das sequências pode permitir a utilização das mesmas como alvos biotecnológicos no desenvolvimento de culturas ou na intervenção em processos fisiológicos, uma vez que estudos prévios demonstraram comportamento diferente das sequências sob condições de estresse e aplicação de ABA (GONZALEZ, 2018).

A bioinformática é o ramo da biotecnologia dedicado à análise de dados oriundos de fontes biológicas, como sequências gênicas e proteicas, bem como suas estruturas e interações metabólicas. Atualmente as ferramentas de bioinformática permitem formular análises e predições *in silico*, por via computacional, que posteriormente possam ser testadas em bancada.

Uma correta caracterização das prováveis sequências *CYP707A* identificadas em *Fragaria ananassa* é possível com o auxílio da bioinformática, bem como a construção de uma plataforma para realização do silenciamento desses genes *CYP707A*. Tais técnicas associadas podem possibilitar uma maior confiabilidade da identidade das sequências, bem como permitir analisar o comportamento do organismo durante a maturação e desenvolvimento de frutos, possibilitando o futuro desenvolvimento de tecnologias que atendam a crescente demanda por alimentos biofortificados ao mesmo tempo que podem permitir um maior controle do processo de amadurecimento, impactando no processo de colheita e pós-colheita, evitando o desperdício de alimentos e perdas da cultura.

2 OBJETIVOS

Realizar análises *in silico* de genômica estrutural e comparativa visando caracterizar os genes *CYP707A* de *Fragaria ananassa*.

Objetivos Específicos

Realizar busca por domínios, peptídeo sinal e porções consituintes das sequências *CYP707A*;

Realizar análises filogenética comparativa entre as sequências identificadas com as de outras espécies da família das *Rosaceaes*;

Realizar análise de interatoma das proteínas *CYP707A*;

Desenhar *primers* e montar por bioinformática (*in silico*) o vetor viral TRV com os insertos específicos para cada *CYP707*; e

Realizar os experimentos iniciais para permitir a montagem o vetor TRV com cada inserto *CYP707A* específico *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O morango

O morango (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) é um pseudo fruto nativo das regiões de clima temperado e cultivado globalmente com produção total estimada em 9,125,913 de toneladas no ano de 2018. Atualmente a China é a maior produtora mundial detendo cerca de um terço da produção, seguida dos Estados Unidos da América, detentor de um sexto. Combinadas as duas nações detém 57% da produção mundial enquanto o Brasil ocupa a posição 57 do ranking (FAO, 2017).

Sua importância econômica está na crescente demanda e na extensa mão de obra empregada em seu cultivo, processamento e comercialização. O constante desenvolvimento de cultivares adaptadas às diferentes regiões de cultivo, bem como a melhora das características sensoriais e nutricionais da cultura, contribuem com o aumento da procura (JI et al., 2012; SYMONS et al., 2012). No Brasil a produção é superior a 70 mil toneladas, com destaques aos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul (IBGE - www.ibge.gov.br).

A espécie pertence à família das *Rosaceae*, do gênero *Fragaria*, e atualmente existem mais de 600 cultivares comerciais que diferem na sua composição bioquímica, fenotípica e características sensoriais, sendo ainda influenciadas não apenas pelo genótipo, mas pelo processo de cultivo e manuseio pós-colheita (ANTUNES et al., 2010; PADULA et al., 2013; ERKAN et al., 2008).

Além de apreciada pelas suas características sensoriais como a coloração vermelho brilhante intensa, odor típico, textura macia, sabor levemente acidificado, e aroma composto por mais de 350 compostos voláteis que atribui grande complexidade e particularidade ao fruto (SCHAART et al., 2013; VANDENDRIESSCHE et al., 2012), o morango é reconhecido pelas suas propriedades bioquímicas, por ser uma fruta rica em compostos bioativos/antioxidantes, como os compostos fenólicos flavonoides (quercetina, kaempferol e miricetina); ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico e elágico; ácido hidroxicinâmico (p-cumarico); taninos hidrolisáveis (elagitaninos), catequina, epicatequina; vitamina C, vitaminas do complexo B e antocianinas (pelargonidina 3-glicosídeo), sendo este o pigmento mais comum desta cultura (ROCHA, 2010; GIAMPIERI et al., 2012; PINELI et al., 2011; ERKAN et al., 2008).

O potencial fitoquímico atribui ao consumo do morango propriedades promotoras de saúde, fazendo com que a fruta seja reconhecida como alimento funcional. Tais compostos são conhecidos por exercer ação antioxidante, antioncogênica, neuroprotetora, antimicrobiana, dentre outros (AFRIN et al., 2016), além de estarem diretamente associados à capacidade da fruta de resistir a estresses bióticos e abióticos no pós- colheita, aumentando sua vida e qualidade (JIANG et al., 2001).

Via de regra, é possível classificar o amadurecimento de frutos em 'climatéricos' e 'não-climatéricos', de acordo com o comportamento respiratório e a produção de etileno (KIDD AND WEST, 1927, 1930; BAILE, 1964). Climatéricos são aqueles cujos processos de amadurecimento são acompanhados por um expressivo aumento na produção de etileno associado ao aumento das taxas de respiração (GIOVANNONI, 2001; CHERIAN et al., 2014). Por outro lado, os frutos não climatéricos não apresentam tal aumento da taxa respiratória, sendo considerados como não responsivos ao etileno no processo de maturação (JIA et al., 2011). Para estes, estudos demonstram que o fitormônio ácido abscísico (ABA) cumpre importante papel na regulação do amadurecimento, indução da via metabólica de fenilpropanóides e no acúmulo de compostos antioxidantes (CHEN et al., 2016), apresentando acúmulo em sua concentração especialmente durante o decorrer da maturação de frutos, tanto em climatéricos quanto em não-climatéricos (AYUB et al., 2016; LI et al., 2011). Demonstrou-se ainda que a aplicação exógena de ABA induz a produção de pigmentos associados à maturação (JIA et al., 2011).

Frutos climatéricos amadurecem mesmo desprendidos da planta mãe, permitindo que sejam colhidos antes de totalmente maduros para que completem sua transformação metabólica entre o transporte e a comercialização. Como parte do processo metabólico do amadurecimento envolve a dissolução da parede celular, a conversão final de açúcares, o amolecimento da estrutura da fruta e, como consequência, a transformações em organismo altamente perecíveis, a colheita antes de totalmente maduros permite que os danos provenientes do transporte, armazenamento e comercialização dos mesmos seja reduzido, diminuindo desperdícios e perdas financeiras. Embora o cultivo de morango apresente elevada rentabilidade, a baixa resistência mecânica dos frutos ao serem colhidos totalmente maduros, se apresenta como limitante do processo produtivo, ocasionando elevadas perdas e afetando o rendimento da cultura.

3.2 Ácido Abscísico – ABA

Fitormônios, ou hormônios vegetais, são moléculas capazes de modular os processos celulares e afetar o crescimento e desenvolvimento do organismo, interagindo com proteínas receptoras e desencadeando cascatas de sinalização, ativando respostas mesmo em concentrações extremamente baixas. (TAIZ et al., 2017).

O ácido abscísico (ABA) é um fitormônio de estrutura composta por 15 carbonos descrito na década de 1960 como participante da regulação de abertura e fechamento de estômatos, bem como do murchamento em plantas (TAIZ et al., 2017). Com o passar do tempo atribuiu-se ao ABA influência sobre crescimento e desenvolvimento vegetal, relacionando-o com o processo de abscisão foliar, de onde seu nome deriva. Atualmente o papel do ABA é associado à maturação embrionária, dormência de sementes, desenvolvimento radicular, bem como divisão e alongamento celular, germinação, indução floral e como hormônio do estresse, uma vez que estes tendem a induzir sua síntese (ISMAIL et al., 2014; GOLLDACK et al., 2014; SAH, 2016). O hormônio tem sido proposto como importante via de regulação do amadurecimento de frutos, especialmente não-climatéricos (LI et al., 2011)

3.2.1 Rotas metabólicas

O ácido abscísico apresenta três principais vias metabólicas: a síntese *de novo*, a via de glicosilação e a de inativação. A da síntese *de novo*, que é amplamente descrita e compreendida em plantas superiores, já existindo diversos mutantes identificados pela rota, permitindo o estudo e compreensão de suas interações, é promovida pelas enzimas NCED (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase), a enzima chave da biossíntese de ABA (WHEELER et al., 2009). A via de inativação reversível por glicosilação, também bem descrita, é promovida pelas enzimas GTs (UDP-glicosiltransferases), resultando em ABA-Glicosil Éster (ABA-GE) ou ABA-Glicosil Éter (ABA-GS), que podem ser convertidos novamente a ABA pela ação de β -glicosidases (BG) (NAMBARA & MARION-POLL, 2005; VIGHI et al., 2019). No entanto a terceira rota, de inativação irreversível promovida pelas enzimas CYP707A (Ácido Abscísico 8' – Hidroxilase 4) ainda é pouco elucidada. Nesta rota metabólica, o ABA é convertido em ácido faseico (PA) e posteriormente a ácido

dehidrofaseico (DPA) (HARTUNG et al., 2002; JIANG AND HARTUNG, 2007; SEO AND KOSHIBA, 2011; BURLA et al., 2013).

Uma representação da integração das vias metabólicas pode ser observado na Figura 1.

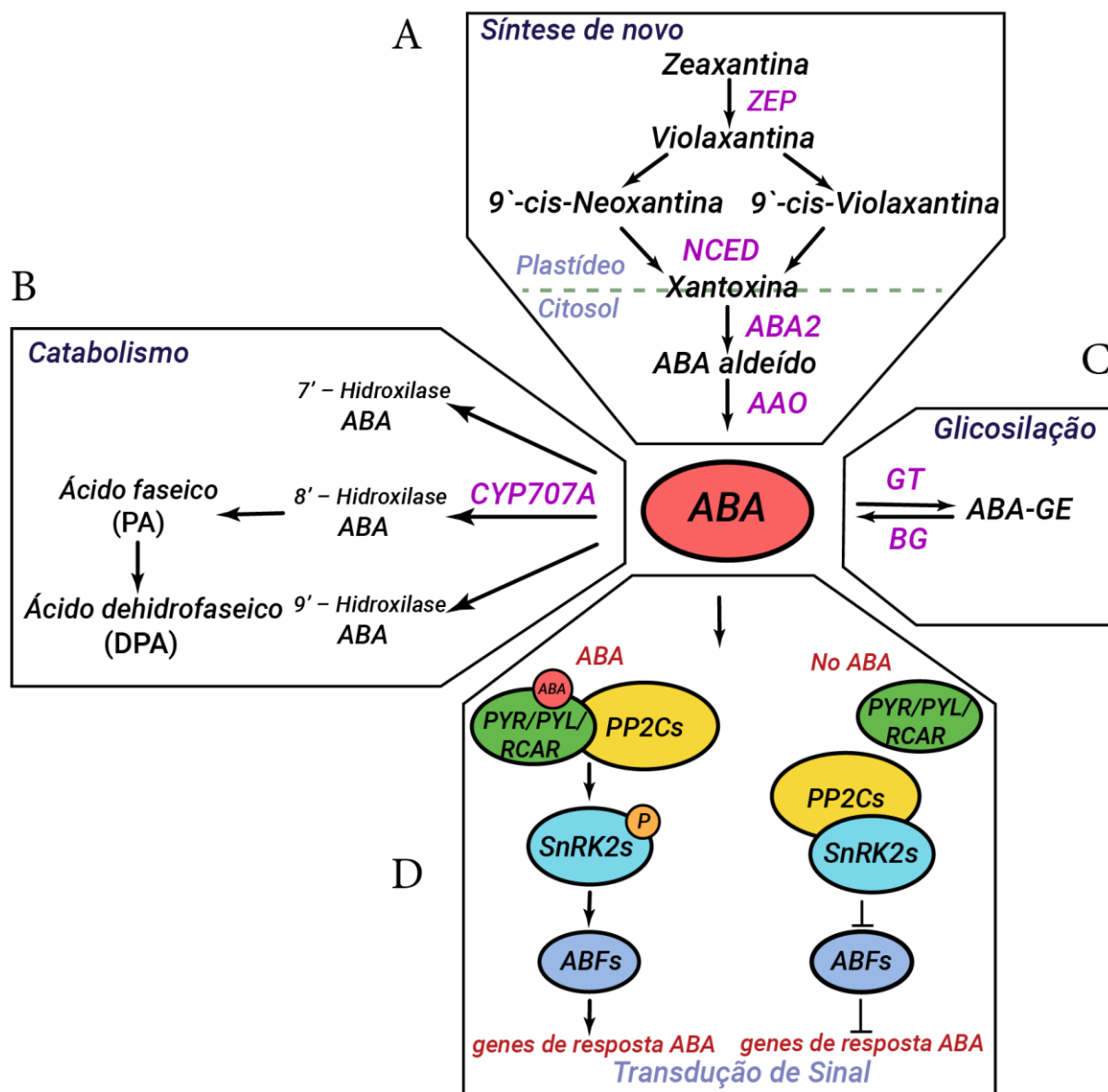


Figura 1. Esquema das rotas metabólicas de síntese *de novo* (A), inativação por glicosilação (C) e inativação irreversível do ácido abscísico (B), além da cascata de sinalização (D). É possível observar a via de síntese pela enzima NCED, a glicosilação/inativação reversível pelo conjunto GT/BG, além da via catabólica promovida pela ação da CYP707A.

Fonte: Leng, P (2014), adaptado e traduzido.

3.2.2 Síntese *de novo*

Em *Arabidopsis*, a biossíntese do ABA se inicia dentro do plastídeo vegetal pela conversão do carotenóide zeaxantina em trans-violaxantina através da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP/AtABA1). Em seguida, o ácido 9-cis-violaxantina e/ou 9-cis-neoxantina sofre clivagem oxidativa catalisada pela enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase (NCED), resultando no carotenoide xantoxina, que é exportado ao citosol, onde é convertido em aldeído abscísico pela enzima ADR/AtABA2, sofrendo então oxidação a ABA pela ação da enzima aldeído-oxidase (AAO/AO) (SEILER et al., 2011).

Wheeler et al. (2009) demonstrou que em uva as enzimas NCED cumprem papel chave na via *de novo* do ácido abscísico e, posteriormente, experimentos de superexpressão demonstraram que NCED são limitadores da taxa de biossíntese do ABA, bem como o acúmulo do hormônio está diretamente ligado ao aumento das taxas de expressão dos genes *NCED* em tomate e *Arabidopsis thaliana* (THOMPSON et al., 2000; IUCHI et al., 2001; TUNG et al., 2008; JONES, 2015).

Genes *NCED* se apresentam como família gênica em diversas espécies, sugerindo que as diferentes cópias tenham papéis particulares durante o desenvolvimento vegetal, podendo ainda apresentar funções tecido-específicas. Desde que primeiramente isolado em mutantes de milho (TAN et al., 1997), a enzima tem sido clonada e caracterizada em várias espécies climatéricas como maçã (LARA AND VENDRELL, 2000), pêssigo (ALVARO et al., 2013), tomate (BURBIDGE et al., 1999) e melão (SUN et al., 2013), além de não climatéricas como laranja (RODRIGO et al., 2006) e uva (WHEELER et al., 2009).

Ao menos quatro sequências *NCED* foram descritas e clonadas de tomate (*Solanum lycopersicum*), e os estudos indicam que a regulação do ABA a nível transcricional na espécie, bem como na resposta à desidratação, é regulada principalmente por *SINCE1* (ZHANG et al., 2009a). A superexpressão de *SINCE1* promoveu o acúmulo do hormônio, a tolerância à seca e reduziu a taxa respiratória (THOMPSON et al., 2000), enquanto plantas mutantes deficientes em ABA apresentaram decréscimo no peso médio dos frutos e não apresentaram desenvolvimento e maturação normais. Ainda, o silenciamento de *SINCE1* via RNAi (RNA de interferência – silenciamento gênico) resultou na redução da concentração endógena de ABA, e inibição

da degradação da parede celular, indicando papel indispensável do hormônio no desenvolvimento e maturação do fruto (SUN et al., 2012a, b).

Cultivares transgênicas superexpressando genes *NCED* resultaram em plantas com maior resistência ao estresse e tolerância à seca, ao frio e à salinidade em diversas espécies como o agrostis, o tabaco, as petúnias e o tomate, apresentando melhora na resposta aos estresses abióticos (SAH et al, 2016).

O ABA tem sido apontado ainda como promotor do metabolismo de açúcares e acúmulo dos mesmos nas frutas, sendo associado à regulação do amadurecimento de frutos não-climatéricos. O envolvimento das enzimas *NCED* no amadurecimento de diversos frutos já foi apontado, incluindo abacate, laranja, uva, pêssego, tomate e morango. (CHERNYS AND ZEEVAART, 2007; RODRIGO et al., 2006; ZHANG et al., 2009^a; ZHANG et al., 2009^b). O morangueiro tem sido vastamente utilizado como modelo para o estudo da maturação de frutos não-climatéricos, tendo o ABA como principal indutor (KANO AND ASAHIRA, 1981; MANNING, 1994; PERKINS-VEAZIE, 1995; JIANG AND JOYCE, 2003).

Estudos recentes mostram que o ABA pode apresentar papel significativo no amadurecimento de frutos de morango, uma vez que sua aplicação exógena acelera significativamente esse processo e o silenciamento de *FaNCED1*, ocasionou retardo no amadurecimento associado à diminuição no conteúdo do hormônio (CHEN et al., 2011; JIA et al., 2011). Ainda, a aplicação exógena de ABA em frutos ligados à planta mãe acelerou o processo de amadurecimento e a aquisição de coloração, pelo aumento da concentração de antocianinas, enquanto a aplicação de um inibidor da biossíntese do hormônio resultou em frutos brancos. Embora a sinalização promovida por ABA não esteja totalmente elucidada, dois receptores (*FaCHLH/ABAR* e *FaPYR1*) foram demonstrados funcionais e responsivos ao ABA, afetando o desenvolvimento de frutos quando silenciados (JIA et al., 2011; CHAI et al., 2011).

Jia et al. (2011) observou que o silenciamento do gene *FaNCED1* em morango afetava negativamente o acúmulo de ABA, enquanto que diversos estudos e outras culturas não apresentam correlação entre a expressão dos genes *NCED* e o níveis de ABA, sugerindo que a dinâmica do acúmulo deste hormônio pode ter uma regulação que inclua processos de homeostase entre a síntese e o catabolismo, de maneira mais

complexa, restando ainda outros genes *FaNCED* a serem caracterizados. Sugere-se que a concentração de ABA seja resultado de um balanço dinâmico entre síntese, catabolismo e reativação, onde a expressão espaço-temporal dos genes ligados ao hormônio responde aos níveis transcricionais de concentração do mesmo (LENG et al, 2014).

3.2.3 Glicosilação

O ácido abscísico pode ser inativado de forma reversível (glicosilação) ou irreversível (degradação). Na inativação por glicosilação, ocorre a hidroxilação seguida da conjugação do ABA em ABA-Glicosil Ester (ABA-GE) ou ABA-Glicosil Éter (ABA-GS), uma reação catalisada por UDP-glucosiltransferases citosólicas (GTs). O ABA conjugado em ABA-GS pode ser reativado pela ação de enzimas β -glucosidases (BGs), através de transporte intracelular e intertesticial (entre tecidos), afetando a homeostase do ABA em diferentes lugares na planta (HARTUNG et al., 2002; JIANG AND HARTUNG, 2008; SEO AND KOSHIBA, 2011; BURLA et al., 2013).

Estudos demonstraram que em resposta à desidratação celular, o ABA-GE pode ser acumulado em organelas como os vacúolos e no apoplasto, para posteriormente ser translocado ao retículo endoplasmático (JONES, 2015). Duas enzimas β -glucosidases (BG1 e BG2) foram identificadas em *Arabidopsis* atuando em resposta à desidratação (LEE et al., 2006; XU et al., 2012).

Em tomate, uma característica sensorial que atribui sabor defumado ao fruto foi associada aos genes *GT* e, o gene *NSGT1* (*eng: non-smoky glycosyltransferase1*/pt.br: glicosiltransferase1 não-defumada) foi identificada na espécie (TIKUNOV et al., 2013). Em morango, os padrões de expressão de *FaBG3* são diretamente relacionados com os de acúmulo de ABA durante o amadurecimento e estudos com silenciamento gênico por RNAi demonstraram que o gene *FaBG3* não está apenas relacionado ao amadurecimento das frutas, mas que também está relacionado à resistência à doenças (LI et al., 2013).

BGs e GTs são membros de grandes famílias gênicas e seus papéis na regulação dos níveis de ABA durante o amadurecimento dos frutos continuam não elucidados. Futuros estudos são necessários para melhor elucidar e caracterizar as sequências, suas

enzimas e substratos específicos, com seus papéis durante o desenvolvimento das plantas.

3.2.4 Degradação oxidativa

A degradação oxidativa é a via catabólica irreversível do ácido abscísico, e ocorre através da reação de hidroxilação. Nesta via o ABA é degradado à ácido faseico (PA), e então convertido à ácido dehidrofaseico (DPA), principal metabólito derivado do ABA. (SETHA et al., 2005).

Enzimas CYP707A (Ácido Abscísico 8' – Hidroxilase 4), são as principais responsáveis pelo catabolismo do ácido abscísico. Elas são monooxigenases da família P450 (NAMBARA et al 2010; FINKELSTEIN 2013) e mediam a hidroxilação da molécula de ABA preferencialmente na posição C-8' da molécula, como demonstrado em *Arabidopsis* (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004).

São sintetizados a partir dos genes *CYP707A*, que pertencem à família *CYP*, com domínio p450 característico. Tal família gênica apresenta múltiplas cópias dos genes *CYP707A* em diversas espécies, podendo apresentar ação tecido-específica e/ou modular um tipo particular de resposta.

Já foi demonstrado que a regulação de *CYP707A* afeta o balanço dinâmico de ABA (SAITO et al., 2004). O aumento ou perda de função do gene *CYP707A2* em *Arabidopsis* afeta o nível de ABA em mudas, afetando sua sensibilidade a glicose exógena. Ainda, os genes *PacCYP707A1* e *PacCYP707A3* em cereja são regulados positivamente em condições de estresse hídrico e tratamento de ABA (ZHU et al., 2011; REN et al., 2010), enquanto o silenciamento de *PacCYP707A2* resulta na indução do amadurecimento, com aumento da produção de antocianinas e nos níveis de ABA (LI et al., 2015).

Em *Arabidopsis*, assim como em outras espécies, os diferentes genes *CYP707A* apresentam papéis diferentes no metabolismo vegetal, com possível função em tecido-específica e em diferentes estádios de desenvolvimento, respondendo de modo particular aos estímulos ambientais (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004). As quatro enzimas *AtCYP707A* tem sua transcrição estimulada em condições de estresse hídrico, sofrendo regulação negativa quando aplicado ABA exogenamente (JONES, 2015).

Em trigo canadense foram identificadas três sequências homólogas de *CYP707A* denominadas *TaCYP707A1-A3*, onde a comparação genômica indicou a presença de variações alélicas. As análises de expressão gênica demonstraram que *TaCYP707A1* é predominante durante a maturação das sementes, e a contribuição de transcritos totais da sequência apresentam variação entre tecidos e genótipos das diferentes cultivares e quando a sequência é expressa heterologicamente em *Arabidopsis thaliana*, apresenta interferência na dormência de sementes e concentração do hormônio na mesma. Embora *TaCYP707A2* apresente expressão em sementes, as taxas de expressão indicam papel central da *TaCYP70A1* nesse processo (CHITNIS, 2014).

Seis cópias *CYP707A* foram identificadas em amora (*Morus notabilis*) sendo denominadas *MnCYP707A1-A6*. As sequências *MaCYP707A1*, *MaCYP707A3*, *MaCYP707A5*, e *MaCYP707A6* apresentaram expressões elevadas nos primeiros estádios de desenvolvimento do fruto, declinando a níveis baixos nos estádios finais. Quando da aplicação de estresse salino, *MnCYP707A1* teve rápido declínio na expressão, após 24 horas do tratamento, porém todas as sequências apresentaram resposta aos tratamentos de estresse, indicando papéis sobrepostos na regulação de ABA e na resposta aos fatores ambientais. Foi observado ainda variação nas taxas de expressão de cada cópia durante o crescimento e desenvolvimento dos frutos (CAI et al, 2016).

O genoma de *Glycine max* (soja) possui dez genes *CYP707A* e os estudos de estrutura gênica demonstraram uma alta conservação das sequências em relação a outras monocotiledôneas e eudicotiledôneas. As expressões de *GmCYP707A1a-A1b-A2a-A2b-A2c-A3a-A5* foram induzidas em embriões de sementes inibidas, bem como de *GmCYP707A1a-A1b-A2a-A2b* no cotilédone. Experimentos de desidratação e estresse hídrico demonstraram aumento na expressão de *GmCYP707A1a-A1b-A2a-A2b-A2c-A3a-A3b-A4a-A4b-A5* em raízes e folhas, enquanto que a reidratação estimulou a transcrição de *GmCYP707A2a-A2b-A3b-A4a-A5* em raízes, enquanto apenas de *GmCYP707A3b-A5* em folhas (ZHENG, 2012).

3.3 CYP707A em morango

Em morango selvagem (*Fragaria vesca*) as 4 sequências CYP707A identificadas apresentam variação de expressão ao decorrer do processo de amadurecimento dos frutos bem como seu silenciamento promove mudanças de tamanho e estrutura dos frutos, afetando a relação do ABA com AG (ácido giberélico) e outras auxinas (LIAO et al., 2018). Ainda, foi demonstrado que CYP707A em *Fragaria vesca* é um ponto central de regulação da retransmissão entre as auxinas promotoras de crescimento precoce e AG e a promoção tardia de amadurecimento promovida por ABA no desenvolvimento do fruto. (LIAO et al., 2018).

Para *Fragaria ananassa*, apenas uma sequência completa para os genes CYP707A1 havia sido descrita na literatura por JI et al. (2012). Posteriormente, estudos prévios do grupo identificaram por bioinformática 4 prováveis sequências CYP707A em transcriptoma de morango (GONZALEZ, 2018). As sequências CYP707A lá descritas e aqui identificadas como CYP707A1 (CL15525), CYP707A2 (CL17770), CYP707A3 (CL18454), CYP707A4 (CL24483), foram avaliadas quanto ao padrão de expressão sob condições de estresse hídrico e salino, com e sem a aplicação exógena de ABA, permitindo observar um comportamento diferente de cada cópia aos fatores ambientais. A aplicação do estresse salino resultou em aumento da expressão dos genes CYP707A3, enquanto a aplicação de ABA resultou na redução da expressão de todos os genes, com exceção de CYP707A3, que não sofreu alteração, em relação às plantas estressadas não submetidas à aplicação deste fitohormônio, corroborando a possibilidade de ação tecido específica e em diferentes fases do desenvolvimento, em especial a CYP707A3, que apresentou regulação positiva elevada quando as plantas foram submetidas ao estresse, bem como na aplicação exógena de ABA, apresentando taxas de expressão até quatro vezes maior que as outras sequências, como observado em outras espécies (GONZALEZ, 2018; KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004).

3.4 Silenciamento gênico por VIGS

Silenciamento genético por VIGS e agroinfiltração VIGS – Silenciamento Gênico Induzido por Vírus, tem sido utilizado para elucidar a função de genes em plantas e já foi validado em morango. A técnica envolve a inserção de um fragmento do gene de

interesse (com aproximadamente 300 pares de base) em um vetor viral, substituindo genes não essenciais do mesmo ou ainda duplicando a região promotora criando, um sítio de clonagem (FU et al., 2006). Sua versatilidade permite inferir a função de genes e caracterizá-los, através de uma expressão transiente. O uso do morango como modelo para aplicação de VIGS é vantajoso por permitir acompanhar o acúmulo de antocianinas, pois a transformação se dá diretamente no pseudofruto, sendo possível perceber seus efeitos em poucos dias (JIA; SHEN, 2013; TIAN et al., 2015).

A agroinoculação por sua vez permite disseminação célula-célula do vetor transformado, podendo ser sistêmica e resultando em expressão homogênea do transgene na planta em poucos dias. A partir deste ponto, podem ser verificadas as mudanças no padrão de maturação do fruto, da expressão de genes e concentrações de compostos bioativos (CARVALHO et al., 2016). Um Esquema demonstrativo da técnica de VIGS pode ser observado na Figura 2.

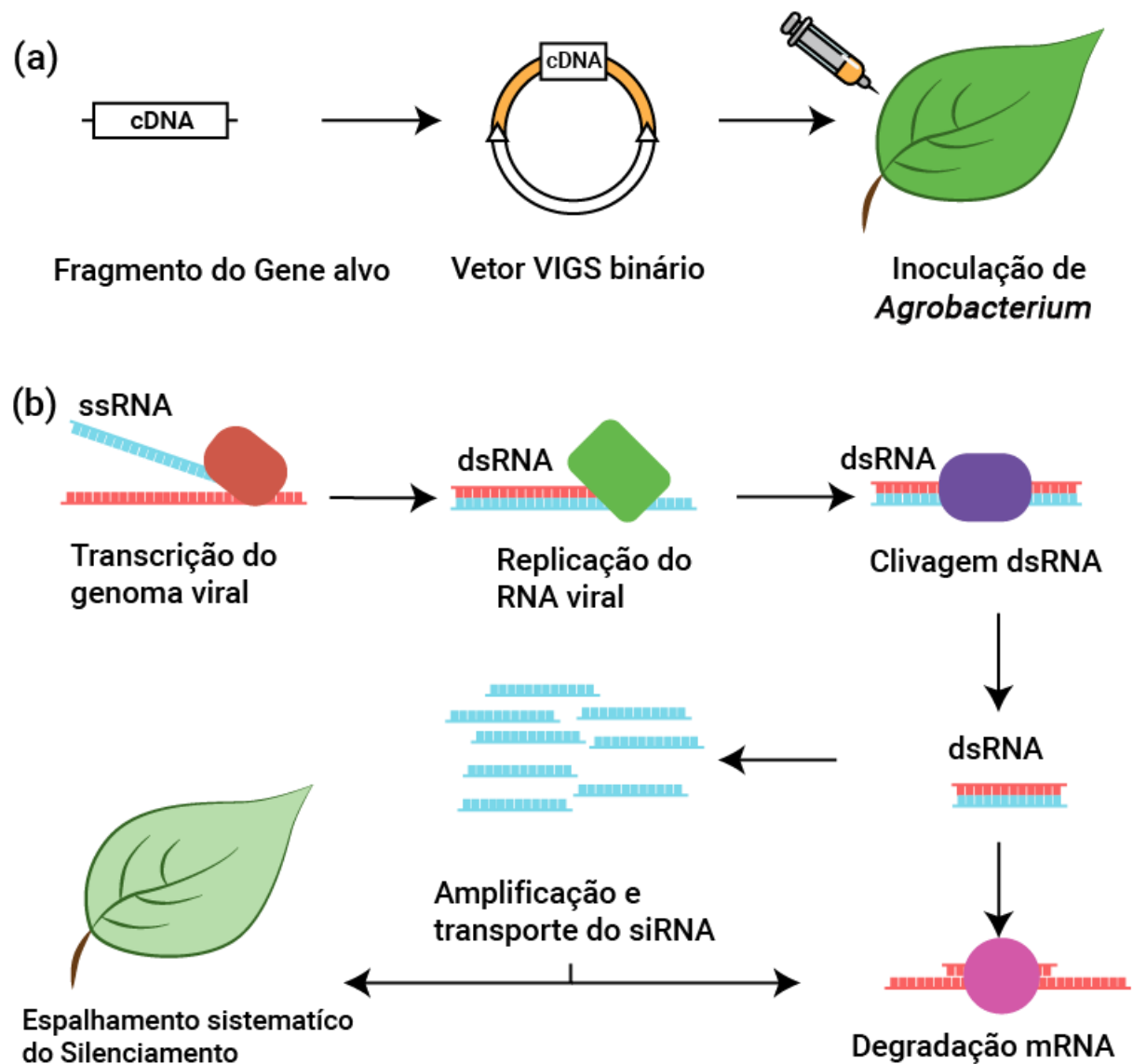


Figura 2 Esquema representativo do silenciamento gênico induzido por vetor viral e agroinoculação. (a) representa o processo de agroinoculação com o vetor viral enquanto (b) apresenta o processo de silenciamento gênico por RNAi induzido pela técnica.

Fonte: Leng, P (2014), adaptado e traduzido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Prospecção das sequências CYP707A no genoma de *Fragaria ananassa*

As ORFs (eng: *open reading frame*/pt:br: fase aberta de leitura) de cada CYP707A identificada no transcriptoma '*in house*' de *Fragaria ananassa* cultivar Camarosa (GONZALEZ, 2018) foram obtidas com a submissão das contigs extraídas do transcriptoma na ferramenta *ORFfinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), e utilizadas para todas as análises presentes neste trabalho.

No decorrer do tempo, foi disponibilizado para consulta uma versão do genoma da *Fragaria ananassa*, composto de *scaffolds*, e então, para avaliar melhor a existência das sequências CYP707A identificadas no transcriptoma, as mesmas foram blastadas ao banco de dados (BD) de *Fragaria ananassa* cultivar Camarosa disponível no *Genome Database for Rosaceae*, disponível em <https://www.rosaceae.org/>, sob nome: "*Fragaria_x_ananassa_Camarosa_Genome_v1.0.a1 (Fxa_v1.2)*". Para realizar o contraste entre as sequências CYP707A e o banco de dados, o mesmo foi montado no *software CLC Genomics Workbench 12.0.2 – Qiagen®*.

As sequências apresentadas com mais similaridades para cada CYP707A foram extraídas em um arquivo *fasta* correspondente e então alinhadas com auxílio do *CLC Genomics*, utilizando o algoritmo ClustalW.

4.2 Alinhamento das sequências CYP707A

Com ajuda do *software MEGA X* foi realizado o alinhamento das sequências CYP707A identificadas em *Fragaria ananassa*, utilizando-se do algoritmo ClustalW.

4.3 Domínios, peptídeo sinal e localização subcelular

Para a realização das buscas por domínios, peptídeos sinal e localização subcelular das sequências CYP707A, foi necessária sua tradução à sequência aminoacídica, com a utilização do *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis – MEGA X* (<https://www.megasoftware.net/>).

As sequências obtidas pela tradução do *MEGA X* foram submetidas ao *SignalPHMM 5.0* – (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), utilizando como parâmetros: Tipo de organismo: Eukarya / Formato de *output*: *Output* longo; *HMMSmart*

no modo *Genomic* - (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), utilizando os parâmetros padrões adicionados da marcação das caixas referentes à: Domínios PFAM e Peptídeos Sinais; e ao *TargetP 2.0* - (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>), utilizando como parâmetro: Tipo de organismo: Planta / Formato de *output*: *Output* longo; para avaliar a presença de peptídeos sinais, porções e localização subcelular das sequências.

4.4 Árvore filogenética

Para construção das árvores filogenéticas, as mesmas sequências *CYP707A* referência utilizadas na identificação das contigs originais das *CYP707A* de *Fragaria ananassa* do transcriptoma '*in house*', acrescidas das sequências *AtCYP707A1-A2-A3-A4* de *Arabidopsis thaliana*, foram submetidas aos algoritmos ClustalW e MUSCLE, para alinhamento. Os identificadores de cada sequência utilizada com a espécie correspondente podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes utilizados na construção das árvores filogenéticas e seus identificadores.

Espécie	Inscrição <i>NCBI</i>
<i>Prunus avium</i>	>GU559990.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559989.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559988.1
<i>Prunus avium</i>	>GU559987.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>JF825450.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>LC155802.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723487.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723486.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723485.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723484.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP723483.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP279631.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP279630.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP162149.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP162148.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>KP057206.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	>JN602256.1
<i>Malus x domestica</i>	>AB593331.1
<i>Malus x domestica</i>	>AB593330.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	> AT4G19230
<i>Arabidopsis thaliana</i>	> AT2G29090
<i>Arabidopsis thaliana</i>	> AT5G45340

Os resultados do alinhamento foram então submetidos três diferentes métodos de construção de árvores filogenéticas: *neighbor joining*, *maximum likelihood* e *minimum evolution*, visando inferir suas proximidades evolutivas.

4.5 Interatoma

As sequências aminoacídicas das CYP707A1-A2-A3-A4, foram utilizadas para construção do interatoma, através da ferramenta STRING 11.0 (*db.org*). Tal metodologia permite observar com quais proteínas as CYP707A interagem e o tipo de interação entre elas, utilizando o proteoma de uma espécie escolhida para comparação. Infelizmente *Fragaria ananassa* não se encontra disponível no banco de dados, porém a espécie selvagem (*Fragaria vesca*) sim, e esta foi utilizada como contraste nas análises.

Ao abrir o site da ferramenta, no index escolhemos a opção *Search*. Na nova seção apresentada, temos uma lista de opções de qual o tipo de uso da ferramenta queremos ter baseada no tipo de informação que temos para realizar as análises. Neste caso, por tratarem-se de mais de uma sequência aminoacídicas, optamos pela subseção Multiple Sequences, que permite a adição de múltiplas sequências aminoacídicas ao *query* de pesquisa.

O arquivo *fasta* com as sequências é adicionado à ferramenta e é escolhida então a espécie referência que mais se aproxime do nosso organismo de estudo. Neste caso, *Fragaria vesca*.

4.6 Montagem do vetor de silenciamento *in silico* e obtenção de fragmentos *in vitro*

4.6.1 Primers e fragmentos para silenciamento

Primers específicos para cada sequência CYP707A identificadas foram desenhados através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen® de modo que os *amplicons* tenham em média de 300 a 400 pares de base, tendo em vista que resultados satisfatórios em VIGS são obtidos com fragmentos amplificados desse tamanho. A temperatura de *melting* (Tm) foi mantida entre 55-62°C e o conteúdo de GC de 45-55%.

Para possibilitar a posterior clonagem dos insertos no vetor de transformação viral TRV2, foram adicionadas às extremidades dos *primers* as sequências nucleotídicas reconhecidas pelas enzimas de restrição, compatíveis com o sítio de múltipla clonagem (MCS – eng: *multiple cloning site*) presente no vetor TRV2.

4.6.2 Clonagem *in silico*

Para avaliar a compatibilidade dos *primers* desenhados realizou-se PCR *in silico* com auxílio do *software Vector NTI Advance 11* para obtenção dos insertos correspondentes a cada sequência *CYP707A* e posterior clonagem no vetor TRV2, avaliando a capacidade dos insertos produzidos de serem corretamente inseridos no sítio de múltipla clonagem do vetor, produzindo plasmídeos montados com as sequências *CYP707A* correspondentes e capazes de realizar o silenciamento desejado.

4.6.3 Amplificação dos fragmentos *CYP707A*

Os *primers* desenhados foram sintetizados pela empresa *Invitrogen*® e testados em protocolos de amplificação por PCR (eng: '*polymerase chain reaction*'/pt:br: reação em cadeia da polimerase), utilizando diferentes gradientes térmicos para anelamento e concentrações de cloreto de magnésio, buscando otimizar o protocolo de amplificação dos fragmentos de interesse. Um protocolo desenvolvido no laboratório foi utilizado e adaptado para testar diferentes concentrações dos *primers* na reação final, bem como diferentes concentrações de cDNA, MgCl, e dNTPs. Ainda, foi utilizado kit comercial *GoTaq® Colorless Master Mix – PROMEGA* na tentativa de amplificar os insertos de interesse.

Para estabelecimento do protocolo em laboratório foram testadas as seguintes variações de volume para cada componente: *Primers* R e F em concentrações de 0,5 e 1 µl; MgCl de 0,5 a 1,5 µl; dNTP entre 1 e 2 µl; cDNA de 1 e 2 µl e Taq Polimerase de 0,2 a 0,5 µl por reação, com volume final de 50 µl, utilizando 5 µl do buffer de reação em 10x.

O protocolo final consistiu de: *Primers* R e F em concentrações de 0,5µl; MgCl de 0,5 µl; dNTP de 1µl; cDNA de 1 µl e Taq Polimerase de 0,2 por reação.

5 RESULTADOS

5.1 Prospecção das sequências *CYP707A* no genoma de *Fragaria ananassa*

No trabalho anterior apresentado em GONZALEZ, 2018, foram pescadas em um transcriptoma (RNA-Seq) ‘*in house*’ de frutos de morango as prováveis *contigs* correspondentes às sequências *CYP707A* da espécie. Foram utilizadas sequências *CYP707A* conhecidas de outras espécies pertencentes à família *Rosaceae*, como iscas contrastadas com o banco de dado (transcriptoma) obtido pelo grupo e como resultado, obteve-se quatro (4) prováveis sequências codificadoras de genes *CYP707A* em morango, sendo estas nomeadas: *CL15525 (CYP707A1)*, *CL17770 (CYP707A2)*, *CL18454 (CYP707A3)* e *CL24483 (CYP707A4)*, sendo que a *CL15525Contig1 (CYP707A1)* corresponde à sequência que já havia sido descrita na literatura por JIA ET AL. (2011).

Ao submeter as *contigs* referentes as *CYP707As*, identificadas no transcriptoma ‘*in house*’, ao *ORFfinder*, foi possível obter as sequências ORF (eng: *open reading frame*/pt:br: fase aberta de leitura) presentes nessas sequências. Tais ORFs foram localizadas em *CYP707A1-A2-A3*, porém não em *CYP707A4*, pois, ao tratar-se de uma sequência nucleotídica muito pequena, não é possível determinar com confiabilidade a sequência ORF que a compõe.

As ORFs identificadas para cada *CYP707A* e a *contig* referente a *CYP707A4* foram utilizadas para todas as análises presentes neste trabalho e estão apresentadas na Tabela 2. As sequências fasta correspondentes as *CYP707A* de *Fragaria ananassa* estão apresentadas no Anexo 9.1.

Tabela 2. Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores ORFs

CONTIG	'NT TOTAL ¹	FRAME	INÍCIO	FIM	NT ORF ²	AA ORF ³
<i>CL15525Contig1</i>	1753	-3	1670	225	1446	481
<i>CL18454Contig1</i>	895	-2	840	>1	840	279
<i>CL17770Contig1</i>	1603	-3	1520	225	1296	431
<i>CL24483Contig1</i>	653	-2	484	194	291	96

¹ Nucleotídeos totais; ² Nucleotídeos da ORF; ³ Aminoácidos da ORF.

Fonte: Gonzalez, 2018.

O alinhamento das sequências *CYP707A* de *Fragaria ananassa* estão apresentadas no Anexo 9.2.

Em 2019 foram disponibilizados os dados genômico (BD) de *Fragaria ananassa* cultivar Camarosa na forma de sequências *scaffolds*. Por este motivo, as quatro sequências de mRNA de *CYP707A* previamente identificadas foram alinhadas ao genoma visando identificar sua origem gênica. Os identificadores das sequências com maior afinidade para cada *CYP707A* estão apresentados na Tabela 3. De acordo com esta tabela, a *CYP707A1* e *CYP707A2* apresentaram maior afinidade com as mesmas sequências do BD, enquanto a *CYP707A3* apresentou maior similaridade com sequências totalmente diferentes. A *CYP707A4* apresentou similaridade com algumas das sequências que se mostraram homólogas às *CYP707A1* e *CYP707A2*, além de outras sequências não apontadas por *CYP707A1*, *CYP707A2* ou *CYP707A3*. O alinhamento das sequências *CYP707A1-A2-A3-A4* com suas respectivas sequências homólogas do banco de dados genômico, base a base, podem ser visualizadas no Anexo 9.3. As representações gráficas dos alinhamentos das sequências com seus homólogos estão disponíveis no Anexo 9.4.

Tabela 3. *CYP707As* e os respectivos códigos identificadores das sequências afim no banco de dados de *Fragaria ananassa*

CYP707A	IDENTIFICADOR
<i>CYP707A1</i>	>ORD_ID5978 >ORD_ID65946 >ORD_ID87415 >ORD_ID86795
<i>CYP707A2</i>	>ORD_ID5978F* >ORD_ID5978I* >ORD_ID65946F* >ORD_ID65946I* >ORD_ID87415F* >ORD_ID87415I* >ORD_ID86795F* >ORD_ID86795I*
<i>CYP707A3</i>	>ORD_ID90279 >ORD_ID67618 >ORD_ID3487
<i>CYP707A4</i>	>ORD_ID5978 >ORD_ID87415 >ORD_ID86795 >ORD_ID65946 >ORD_ID5966

* as letras F e I no final dos indentificadores indica a porção final e inicial das sequências, respectivamente.

5.2 Alinhamento das sequências *CYP707A*

A Figura 3 apresenta uma representação gráfica do alinhamento das sequências *CYP707A*. O alinhamento das sequências base a base, através do algoritmo ClustalW pode ser conferido no Anexo 9.2. De acordo com estas figuras, a *CYP707A2* apresenta um *gap* de 150 nucleotídeos em relação a *CYP707A1*, localizado entre o nucleotídeo 556 e 705 da sequência maior. Por outro lado, as sequencias *CYP707A3* e *CYP707A4* apresentam uma região de similaridade com as *CYP707A1* e *CYP707A2*, do nucleotídeo 743 ao 1415; no restante destas sequências, apenas alguns nucleotídeos de identidade, esporços ao longo da sequência, foram observados. O alinhamento das sequências base a base, através do algoritmo ClustalW pode ser conferido no Anexo 9.2.1

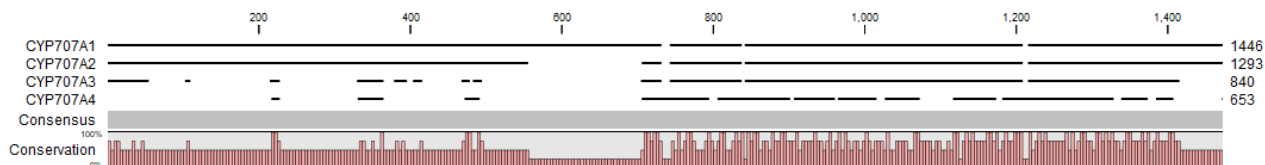


Figura 3. Representação gráfica do alinhamento das sequências CYP707A de *Fragaria ananassa*.

Fonte: CLC Genomics Workbench 12.0.2

5.3 Domínios, peptídeo sinal e localização subcelular

Com a utilização do *software* Mega X foi possível obter a tradução aminoacídica das sequências CYP707A, permitindo que sejam analisadas através de ferramentas de bioinformática para melhor caracterização das enzimas.

Quando as sequências obtidas pela tradução do Mega X foram submetidas ao SignalPHMM 5.0 – (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), HMMSmart no modo Genomic – (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e ao TargetP 2.0 – (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>), foi possível observar nas sequências maiores (CYP707A1 e CYP707A2) a presença de peptídeo sinal (Figura 4) e de uma região transmembrana entre os aminoácidos 2 – 21 das sequências, bem como uma região de baixa complexidade do aminoácido 27 – 39 (Figura 5). As representações gráficas para todas as sequências podem ser encontradas no Anexo 9.5.

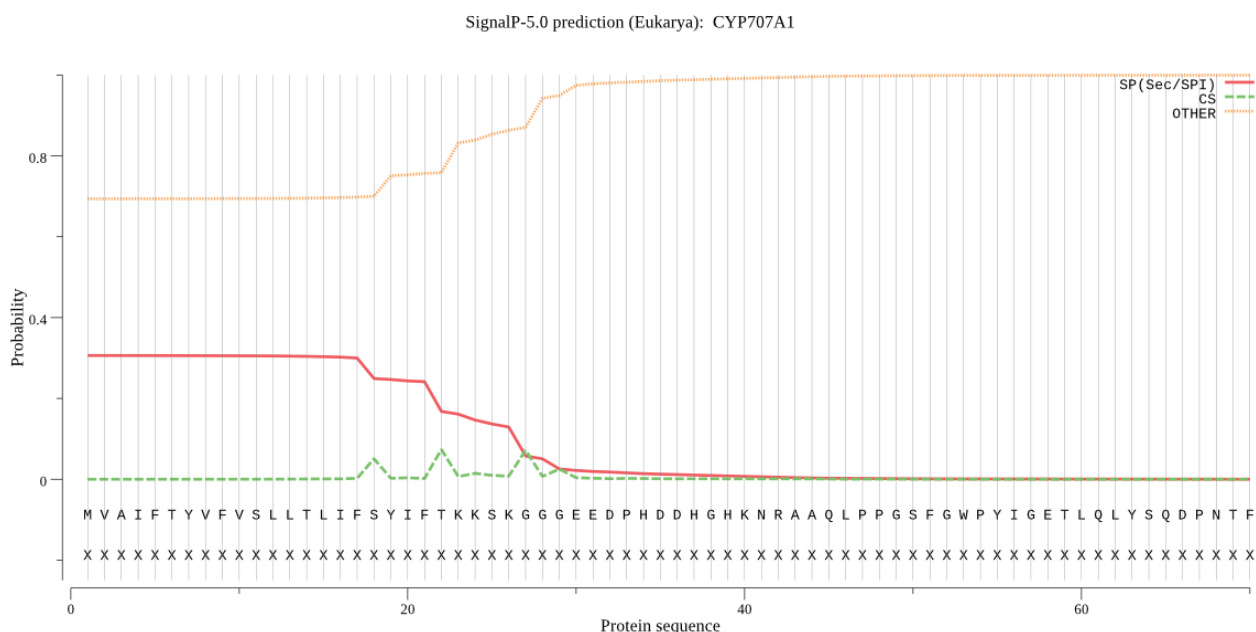


Figura 4. Representação gráfica da predição de peptídeo sinal em CYP707A1 através do SignalP 5.0.

Fonte: SignalPHMM 5.0

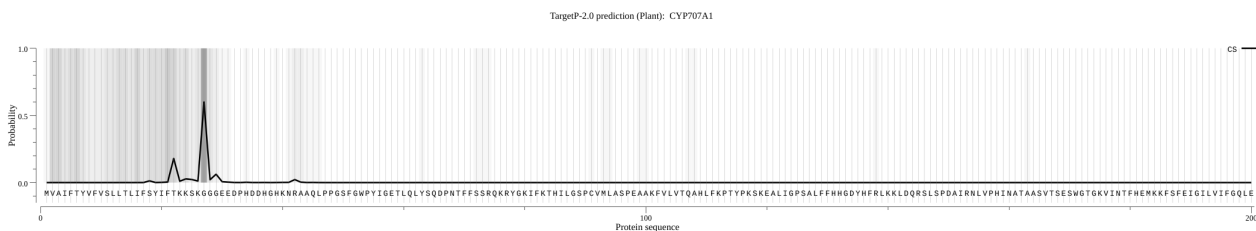


Figura 5. Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A1 através do TargetP 2.0.

Fonte: TargetP 2.0.

As sequências CYP707A1, CYP707A2 e CYP707A3, apresentaram a presença do superdomínio P450 característico das enzimas CYP707A. Tal domínio se apresenta totalmente em CYP707A1, enquanto aparece dividido em dois em CYP707A2, possivelmente associado ao gap existente na sequência em relação à CYP707A1 já apontada pelos alinhamentos com as sequências transcriptômicas disponíveis em banco de dados da espécie. Para CYP707A3 tal superdomínio não é evidenciado, pois a sequência da mesma está incompleta, porém completa o suficiente para evidenciar a

presença da porção P450. A CYP707A4, por seu tamanho reduzido, não permite detectar com confiabilidade a presença do domínio P450 característico na sequência. A representação gráfica do domínio P450 presente na CYP707A1 está apresentado na Figura 6, da CYP707A2 na Figura 7 e da CYP707A3 na Figura 8.

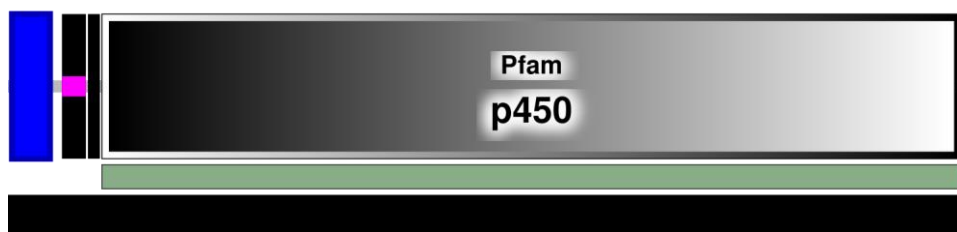


Figura 6. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A1.
Fonte: HMMSmart.



Figura 7. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A2, apresentando a sobreposição do domínio, apontando o possível erro de montagem.
Fonte: HMMSmart.

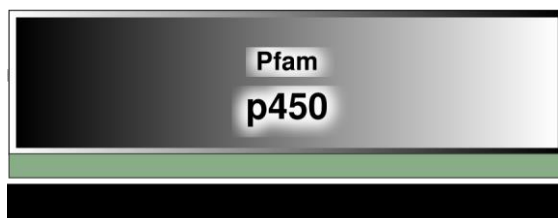


Figura 8. Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A3.
Fonte: HMMSmart.

5.4 Árvore Filogenética

Com a utilização do *software* Mega X foi possível desenhar árvores filogenéticas com as sequências *CYP707A*, comparando-as com sequências *CYP707A* de outras espécies da família das Rosaceae, além das sequências descritas em *Arabidopsis thaliana*.

Independente do alinhamento pelo algoritmo ClustalW ou Muscle, ou da montagem da árvore pelo método de *neighbor joining*, *maximum likelihood* ou ainda *minimum evolution*, as mesmas sequências foram apontadas como mais similares a cada *CYP707A* e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. *CYP707A*s e os respectivos códigos identificadores e espécies das sequências mais próximas apresentadas nas montagens das árvores filogenéticas

<i>CYP707A</i>	Identificador	Espécie
<i>CYP707A1</i> e <i>CYP707A2</i>	>GU559989.1	<i>Prunus avium</i>
	>KP723484.1	<i>Pyrus pyrifolia</i>
	>KP162148.1	<i>Pyrus pyrifolia</i>
<i>CYP707A3</i>	>AB593330.1	<i>Malus x domestica</i>
	>KP723483.1	<i>Pyrus pyrifolia</i>
	>KP057206.1	<i>Pyrus pyrifolia</i>
<i>CYP707A</i>	>NC_003071.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Um exemplo de árvore filogenética montada com alinhamento Clustalw e método de *neighbor joining* pode ser observada na Figura 9. Outras árvores resultantes tanto do alinhamento Clustalw ou Muscle, nos três métodos comparativos citados, estão disponíveis no Anexo 9.6.

As sequências *CYP707A1* e *CYP707A2* que apresentam maior similaridade entre si foram agrupadas no mesmo clado que as sequências *PaCYP707A4* de *Prunus avium*, *PpCYP707A2* de *Pyrus pyrifolia* das cultivares Mixue e Huanghua. A *CYP707A3* por sua vez foi alocada no mesmo clado que as sequências *MdCYP707A1* de *Malus domestica*

e *PpCYP707A1* de *Pyrus pyrifolia* das cultivares Mixue e Huanghua. Tais resultados sugerem que a sequência *CYP707A3* divergiu evolutivamente anteriormente ao surgimento de *CYP707A1-A2*. Cabe salientar que, uma vez que a *CYP707A4* se refere a uma sequência incompleta, suas relações evolutivas podem estar sendo interpretadas de forma errônea ao se considerar apenas parte de sua sequência total ainda não descrita para o gene.

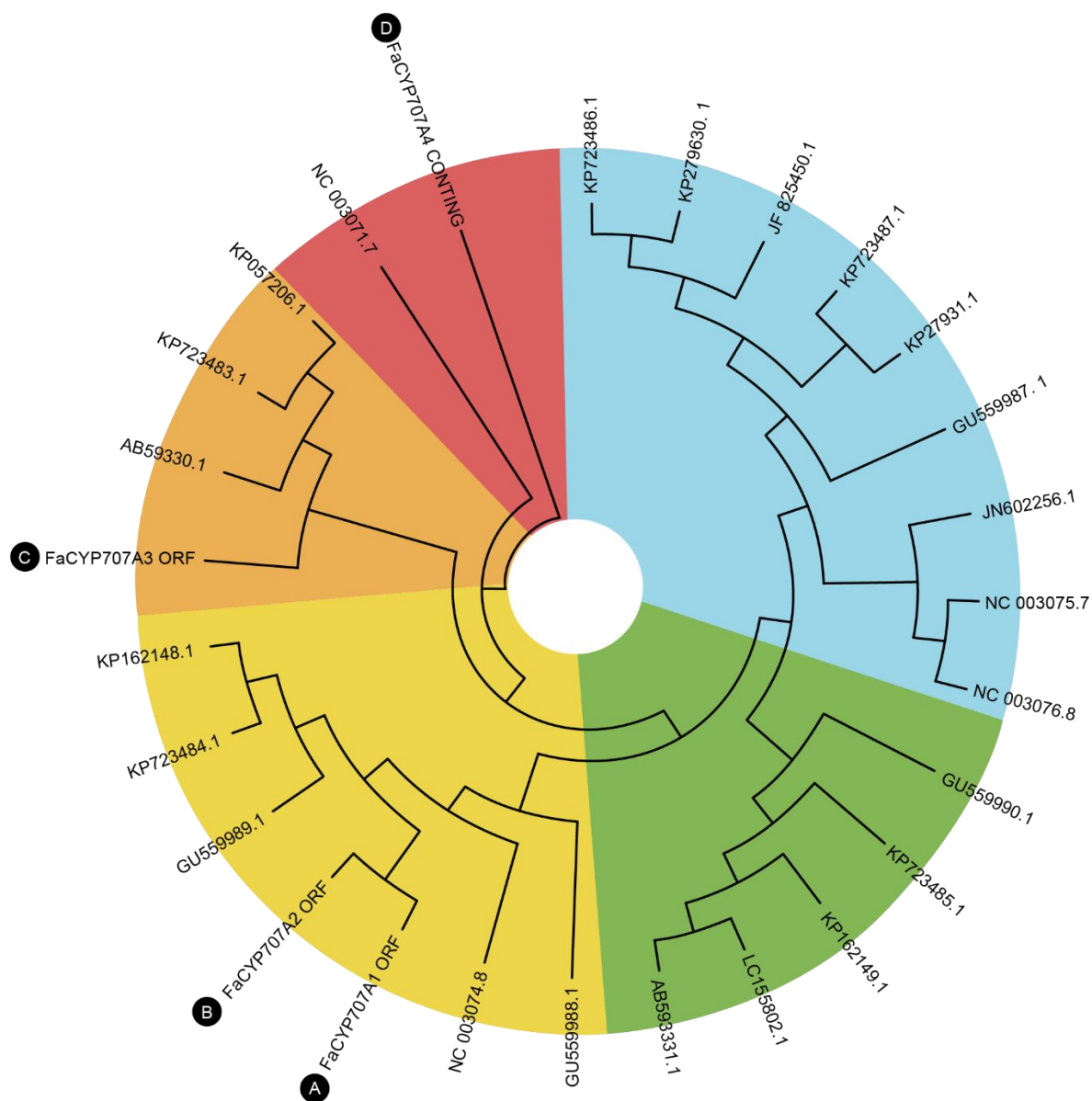


Figura 9. Árvore filogenética construída com algoritmo ClustaW e método *Neighbor Joining*.
Fonte: Mega X, adaptado.

5.5 Interatoma

Quando as sequências aminoacídicas das CYP707A1-A2-A3-A4 de *Fragaria ananassa* foram submetidas ao *STRING 11.0 DB*, foram apresentadas as sequências de *Fragaria vesca* com maior homologia para cada sequência. CYP707A1 e CYP707A2 apresentaram maior identidade com a sequência Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase 3 (XP_004291107.1), sendo de 97% para CYP707A1 e de 87% para CYP707A2. A CYP707A3 apresentou maior homologia (99%) com a sequência de Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase 4 (XP_004294805.1). CYP707A4 não apresentou homologia com nenhuma sequência presente no banco de dados. Ainda, CYP707A1-A2-A3 apresentaram homologia parcial com outras duas sequências Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase 1 (XP_004300683.1) e Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase 2 (XP_004295971.1). O interatoma formado apresenta diferentes tipos de interações, as quais são representadas através de da legenda demonstrada na Figura 10. O interatoma formado está apresentado na Figura 11.



Figura 10. Legenda e significados dos símbolos presentes no interatoma criado com a utilização da ferramenta *STRING 11.0 DB*

Ao observarmos o interatoma percebe-se que as duas sequências homólogas às CYP707A1-A2-A3 de *Fragaria ananassa* em *Fragaria vesca* apresentam as mesmas

correlações com as diversas proteínas presentes no constructo. Dentre elas está presente uma relação *textmining* e de co-expressão com a proteína vegetal isoprenilada associada ao metal pesado tipo 26, que é também conhecida como HIPP (eng: *Heavy metal-associated isoprenylated plant protein*).

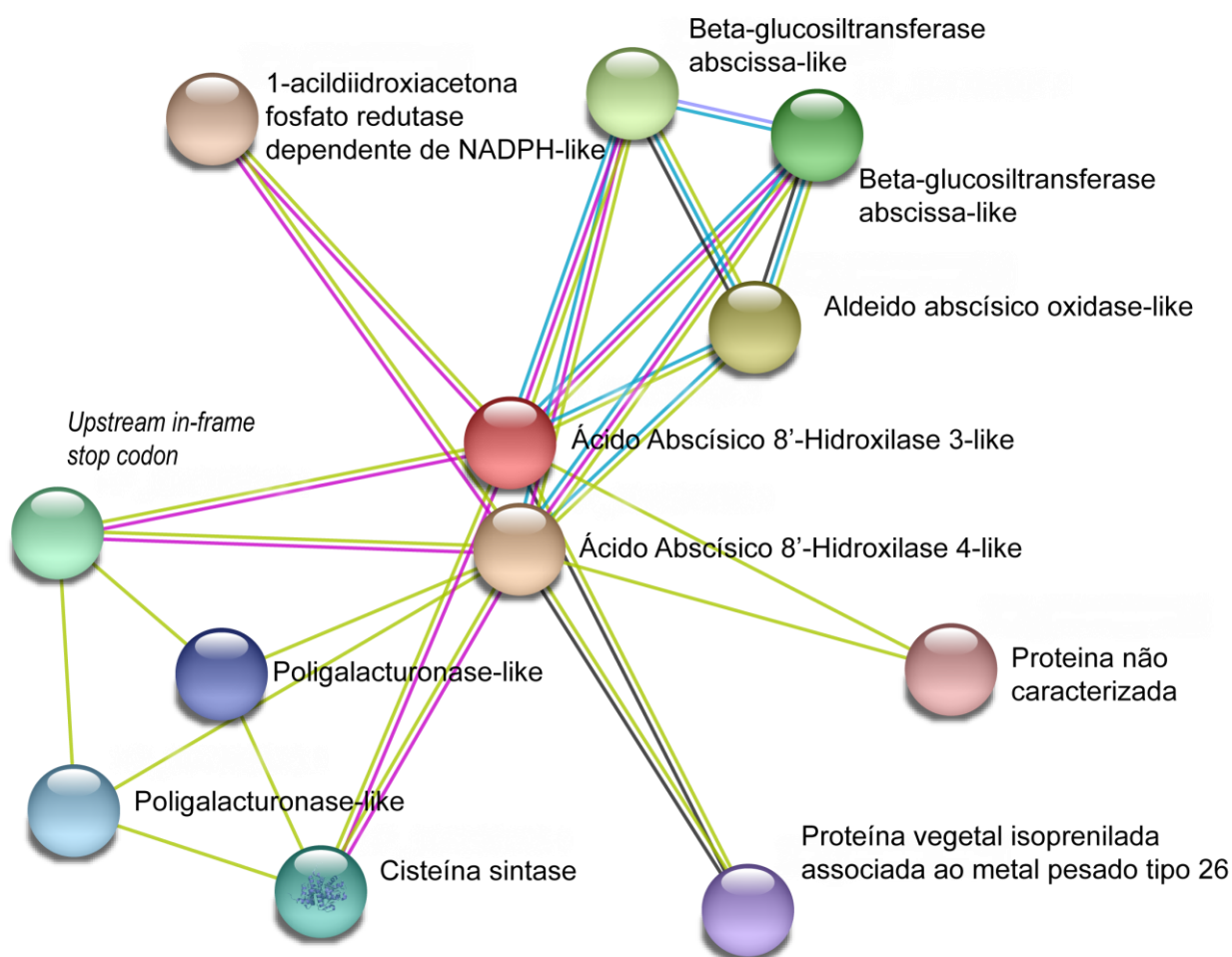


Figura 11. Interatoma das sequências homólogas as CYP707A1-A2-A3 em *Fragaria vesca* criado com a utilização da ferramenta *STRING 11.0 DB*

São apresentadas também interações do tipo *textmining* entre as sequências pesquisadas de beta-Glucosiltransferases, sendo estas interações conhecidas tanto em bancos de dados curados quanto determinadas experimentalmente, demonstrando que de fato tratam-se de proteínas com ligação com a rota do ácido abscísico. A relação do tipo *textmining*, também presente em bancos de dados curados, com Aldeido Abscísico

Oxidase (AAO), corroboram essa relação, uma vez que a enzima AAO cumpre papel fundamental na síntese *de novo* do ABA.

O interatoma montado apresenta ainda interação do tipo *textmining*, demonstrada experimentalmente, com Cisteína Sintase, Poligalacturonase, além de apresentar mesma interação com 1-Acildiidroxiacetona Fosfato Redutase dependente de NADPH.

5.6 Montagem do vetor de silenciamento *in silico* e obtenção de fragmentos *in vitro*

5.6.1 Primers e fragmentos para silenciamento

Para obtenção dos insertos (fragmentos de 300 a 350 pares de base presentes nas sequências alvo para as quais se quer construir um vetor de silenciamento gênico), foram desenhados *primers* com alta especificidade para cada sequência *CYP707A* a ser silenciada, acrescidos de sequência correspondentes ao sítio de restrição de enzimas de restrição a serem utilizadas na clonagem em vetor TRV. Foram obtidos *primers* capazes de amplificar com confiabilidade e especificidade as sequências de interesse *in silico*, com tamanhos variando de 17 a 24 nucleotídeos, para além das regiões de equivalência às enzimas de restrição, com temperaturas de anelamento em torno dos 53° C.

No *Vector NTI Advance 11* foi possível analisar a sequência nucleotídica do vetor de transformação TRV2, localizando o sítio de múltipla clonagem (MCS) onde o inserto de interesse é clonado para posterior silenciamento. As enzimas de restrição presentes no MCS do vetor TRV2 estão demonstradas no Anexo 9.7.

Os *primers* desenhados estão apresentados na Tabela 5, com suas respectivas enzimas de restrição, compatíveis com o sítio de múltipla clonagem presente no vetor TRV2.

Uma representação gráfica do fragmento de uma cópia *CYP707A* com seus primers e enzima de restrição correspondente pode ser observado na Figura 12.

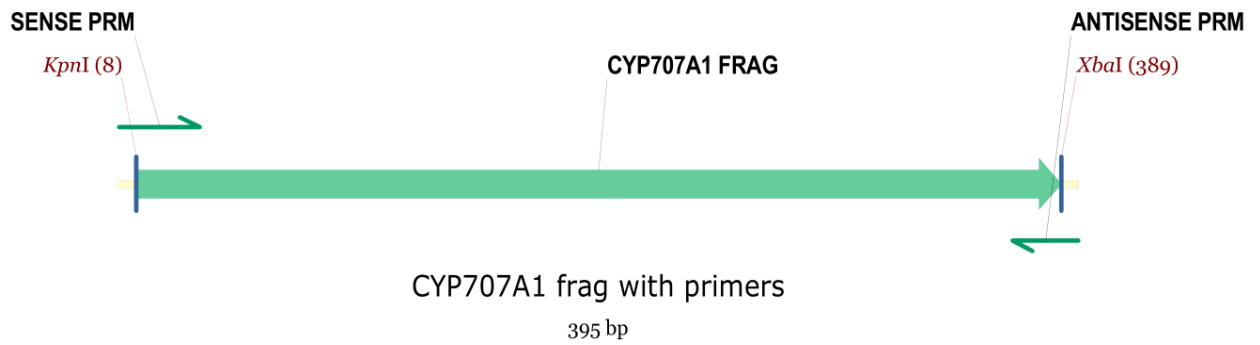


Figura 12. Representação do fragmento da sequência *CYP707A1* com seus primers e enzimas de restrição compatíveis com o vetor TRV2

Fonte: *Vector NTI Advance*.

Tabela 5. Primers *Forward (F)* e *Reverse (R)* para cada sequência *CYP707A* com as respectivas enzimas de restrição para clonagem no vetor TRV2.

Nome	Sense	Enzima de Restrição	Sequência enzima + <i>primer</i>	Temp. Anelamento ° C **		Dímeros	Kcal/Mol	Amplicon
CYP707A1	F	XbaI	GC TCTAGA GC GGCTTTGTTGGCGAGGG	69.6	53.7	0	0	395pb***
	R	KpnI	GG GGTACC C CAGTCTCAAACCTCTCCAACACAAC*	69.6	52.3	2	2.1	
CYP707A2	F	XbaI	GC TCTAGA GC GAAGGCGAGGGAGAGGC	68.6	51.8	0	0	389pb***
	R	KpnI	GG GGTACC C CAGTCTCAAACCTCTCCAACACAAC*	69.6	52.3	2	2.1	
CYP707A3	F	XbaI	GC TCTAGA G CAAAATGAAAAGGGGCAAAAC	64.7	53.1	0	0	299pb***
	R	KpnI	GGTACC GCGAAAGATATGATGCTGGC	64.3	52.4	1	1.1	
CYP707A4	F	KpnI	GG GGTACC C CATCGTACTACCCCCAGCAA	70.3	52.5	1	2.7	334pb***
	R	SacI	C GAGCTC GCACCAAAGCCAAATACATTT	66.3	51.2	2	1.1	

*mesmo *primer reverse* utilizado para as sequências *CYP707A1* e *CYP707A2* dada a similaridade das sequências.

** = primeira temperatura referente à molécula completa, com sequência da enzima de restrição, e segunda temperatura apenas do *primer* sem enzimas de restrição

***pb = pares de base.

5.6.2 Clonagem *in silico*

Com os *primers* desenhados e os insertos correspondentes a cada *CYP707A* obidas pela PCR *in silico*, no *Vector NTI Advance 11*, foi possível realizar a clonagem do inserto no vetor de transformação viral TRV2, resultando em quatro montagens de vetor, uma para cada *CYP707A*, que foram inseridas no sítio de múltipla clonagem do plasmídeo.

Uma representação gráfica do vetor TRV2 com o inserto de *CYP707A1* clonado pode ser observado na Figura 13. Esta representação permitiu confirmar que a projeção dos primers estava correta, permitindo a inserção do inserto na posição e orientação correta em relação ao promotor.

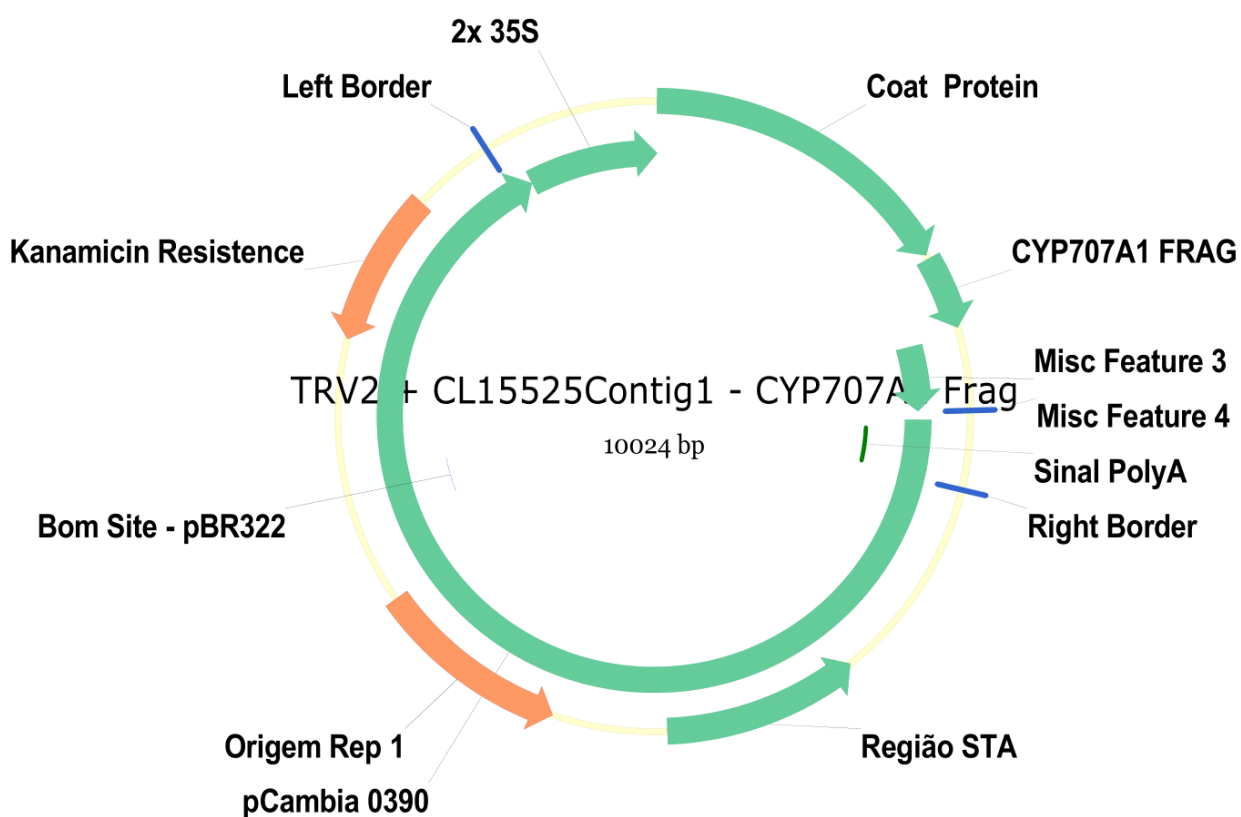


Figura 13. Representação do fragmento da sequência *CYP707A* clonado no vetor TRV2.
Fonte: *Vector NTI Advance*.

5.6.3 Amplificação dos fragmentos de *CYP707A*

Com os *primers* sintetizados foi necessário realizar a otimização do protocolo convencional de PCR, de modo a avaliar a melhor temperatura de anelamento e amplificação dos insertos.

Os insertos correspondentes a *CYP707A2* e *CYP707A4* apresentaram amplificação de bandas em todos os protocolos testados, tendo melhor temperatura de anelamento estabelecida como 55 °C. *CYP707A1* e *CYP707A3* apresentaram comportamento imprevisível, não resultando em amplificação na maioria absoluta dos protocolos desenvolvidos no laboratório, e uma baixa amplificação quando utilizado o protocolo padrão do kit comercial *GoTaq® Colorless Master Mix*, resultado esse não reproduzível com confiabilidade.

Tais comportamentos levantam a suspeita de que possam haver erros na síntese dos *primers* pela empresa contratada, uma vez que os *primers* desenhados para a sequência *CYP707A1* já haviam sido descritos na literatura e utilizados no laboratório, resultando em amplificação. Ainda é possível que as sequências apresentem polimorfismos não refinados pelo processo de montagem das *contigs in silico*, áreas de *splicing alternativo* ou outras características que influenciem negativamente na capacidade de amplificação das sequências. A Figura 14 apresenta um gel de agarose padrão resultado das tentativas de amplificação das sequências.

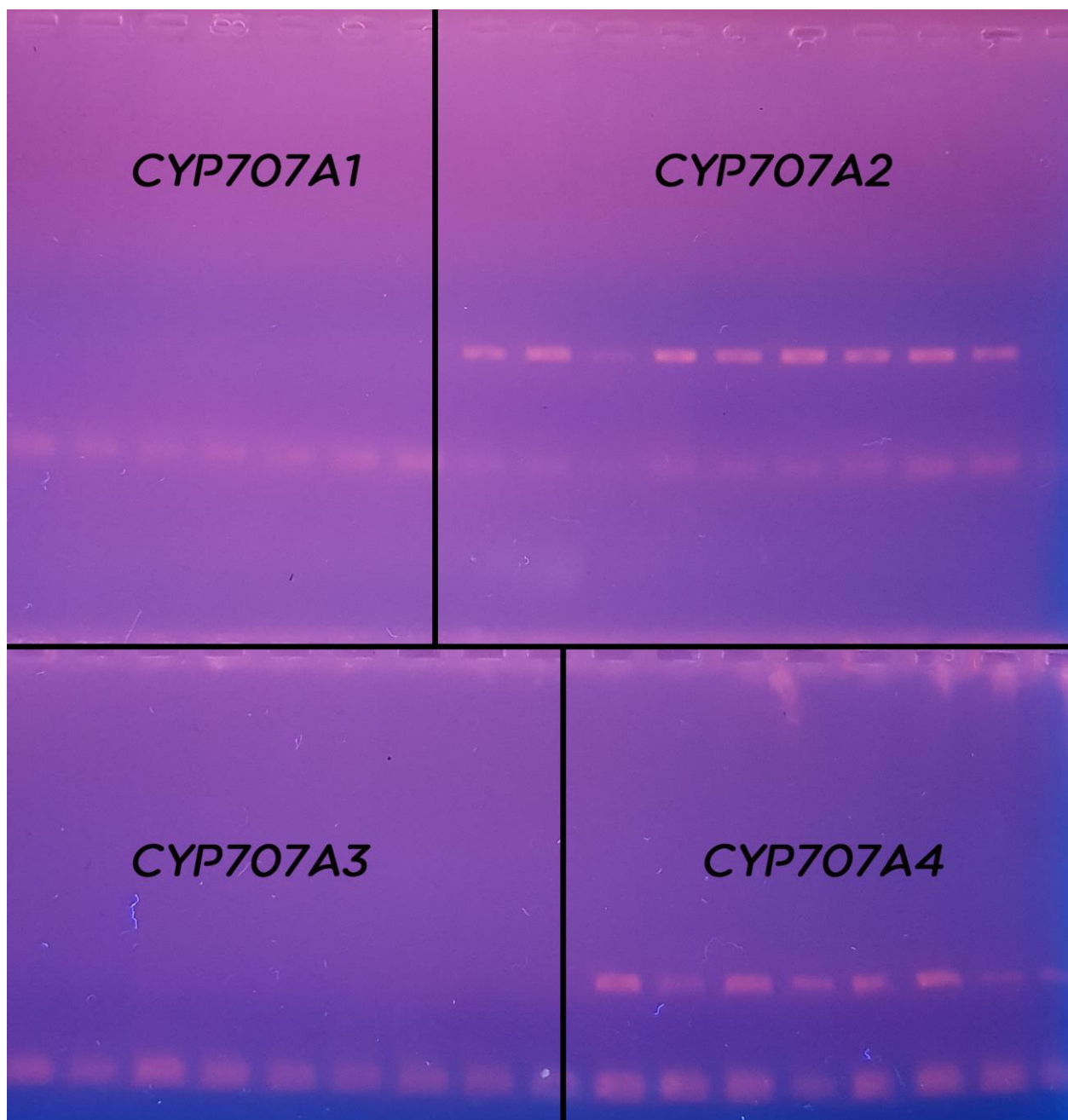


Figura 14. Gel de agarose das tentativas de amplificação das sequências de interesse.

6 DISCUSSÃO

Tem sido atribuído ao ácido abscísico (ABA) importante papel na regulação da maturação e da resposta ao estresse, em diversas espécies vegetais, com foco nos frutos não climatéricos (LI et al., 2011). Das vias metabólicas associadas ao ABA, a de síntese *de novo* é a mais elucidada e tem seu envolvimento nos diferentes processos fisiológicos melhor descrito na literatura, enquanto que a via catabólica, onde o ABA é convertido a PA e DPA pela ação de enzimas CYP707As ainda é pouco elucidado (SETHA et al., 2005).

Em morango (*Fragaria ananassa*) Gonzalez (2018) relatou a existência de 4 cópias de CYP707As presentes em bancos de mRNA. No presente estudo, diversas análises de genômica estrutural e comparativa foram realizadas a fim de determinar suas relações evolutivas e predizer suas funções visando guiar estudos futuros de genômica funcional, além de fornecer informações necessárias para o desenvolvimento do silenciamento gênico das sequências, de modo a permitir observar seu efeito no metabolismo e desenvolvimento da espécie.

De acordo com o alinhamento das sequências é possível observar que CYP707A2 apresenta sequência homóloga a CYP707A1, porém com um gap de 150 nucleotídeos próxima à metade da sequência, sugerindo um erro durante o sequenciamento ou na montagem *in silico*, fazendo parecer ser uma cópia real com diferenças mínimas em relação à CYP707A1. Porém, é possível também que a sequência seja resultado de um *splicing* alternativo que surgiu durante o processo de diferenciação dos genes, uma vez que ambas apresentaram homologia de 100% apenas com a sequência genômica >ORD_ID5978, com a única diferença de que a CYP707A2 apresenta o referido gap. São necessários estudos mais precisos sobre as sequências para validar suas integridades.

A CYP707A3 possui correspondência com três sequências no banco de dados, que não foram apontadas na comparação com as CYP1/A2/A4, indicando que provavelmente se trate de uma sequência CYP707A verdadeira, com diferente histórico evolutivo e que possivelmente exerça funções especializadas na planta. Quando a sequência aminoacídica é comparada com as sequências conhecidas em *Fragaria vesca*, a sequência CYP707A3 apresenta maior homologia com a FvCYP707A4

(XP_004294805.1) com uma identidade de 99%, enquanto CYP707A1-A2 apresentam maior homologia com FvCYP707A3 (XP_004291107.1) com uma identidade de 97% e 87%, respectivamente.

O alinhamento das sequências com as já conhecidas de *Fragaria vesca* permitiu verificar a existência de outras cinco sequências com homologia parcial às sequências identificadas em *Fragaria ananassa*, o que sugere a existência de outras cópias CYP707A em *Fragaria ananassa* que ainda não foram identificadas via bancos de mRNA-Seq, sugerindo que outros estudos com outros bancos de mRNA-Seq, obtidos de diferentes tecidos vegetais e sob diferentes condições experimentais, são necessários para auxiliar a elucidar a existência de outras sequências CYP707A na espécie e promover melhor entendimento do papel das sequências nos diferentes tecidos e processos fisiológicos.

A CYP707A4 é a menor sequência das quatro identificadas, sendo a mais incompleta delas, não sendo possível a identificação do domínio P450 via bioinformática. São necessárias buscas em outros transcriptomas e bancos de dados para avaliar a real existência da sequência e permitir compreender se ela se trata de uma sequência real, ainda não descrita, ou o resultado do *splicing* alternativo das sequências CYP707A1-A2, ou demonstrar ainda tratar-se de uma sequência originária de uma CYP, porém que sofreu deleções de fragmentos gênicos e possivelmente mudou de função durante o decorrer do processo evolutivo.

A montagem de árvores filogenéticas é uma ferramenta que pode auxiliar a entender a origem e deriva evolutiva das sequências genéticas observadas, ajudando a prever a função de cada sequência em comparação às sequências de outras espécies já melhor compreendidas e elucidadas. Ren (2010) demonstrou que durante o desenvolvimento do fruto de *Prunus avium* as diferentes sequências CYP707A descritas na espécie apresentam variação na taxa de expressão gênica, cumprindo papéis sobrepostos no decorrer do tempo. A aplicação exógena de ABA promoveu aumento na expressão das PaCYP707A1 e PaCYP707A3, enquanto diminuiu a expressão de PaCYP707A4 (sequência >GU559989.1 – com maior similaridade com CYP707A1 e CYP707A2). Kondo (2012) demonstrou que MdCYP707A1 (>AB593330.1 – com maior similaridade com CYP707A3) apresenta regulação positiva quando submetida ao

estresse hídrico e desidratação em frutos de Maça, comportamento semelhante ao da *CYP707A3* (GONZALEZ, 2018).

Quando submetidas ao estresse hídrico, as cópias *PaCYP707A1* e *PaCYP707A3* apresentaram aumento significativo em suas taxas de expressão, enquanto não foram observadas diferenças em *PaCYP707A2* e *PaCYP707A4* em frutos desidratados e controle (LI et al., 2015; REN et al., 2010). As sequências também apresentaram variações nas taxas de expressão gênica associadas ao tecido analisado e a fase de desenvolvimento da planta, bem como apresentando resposta diferente ao estresse hídrico e a aplicação exógena de ABA. Comportamento semelhante foi demonstrado com as sequências *CYP707A* de *Fragaria ananassa* (GONZALEZ, 2018), onde as taxas de expressão em resposta ao estresse hídrico e a aplicação exógena de ABA oscilaram entre as cópias gênicas e as fases de desenvolvimento. *CYP707A1* tem a expressão ligeiramente reduzida quando da aplicação de estresse ou da aplicação exógena de ABA, porém apresenta redução maior quando submetida ao estresse e à aplicação exógena de ABA simultaneamente. Enquanto isso, a *CYP707A3* apresenta regulação positiva na aplicação exógena de ABA, na aplicação de estresse e na aplicação de estresse e ABA simultaneamente, indicando que o entendimento das enzimas homólogas em outras espécies pode ser um indicativo do papel dessas cópias no organismo vegetal, corroborando a ideia de respostas particulares/especializadas e da ação tecido-específica das sequências.

As análises do interatoma apresentam interações do tipo *textmining* entre as *CYP707As* e as proteínas HIPP, que são conhecidas por seu envolvimento na homeostase e desintoxicação de metais pesados em plantas, principalmente cádmio, além de atuarem na resposta ao estresse térmico e hídrico, sugerindo que sua relação com as *CYP707As* esteja relacionada com a resposta às mudanças ambientais. Ainda, está presente a interação com Poligalacturonase, enzima que atua no processo de maturação ao degradar pectina, promovendo mudanças estruturais e o amolecimento dos frutos. A relação entre poligalacturonases e a rota do ABA já foi demonstrada, onde a aplicação exógena de ABA ou de Abz (*abscinazole* - inibidor de *CYP707A*) resultaram em maior atividade de poligalacturonases e redução de firmaza dos frutos tratados (JIA et al, 2017).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo permitiu a melhor caracterização das sequências *CYP707A* anteriormente identificadas em transcriptoma de morango, corroborando o entendimento de que se tratam de sequências autênticas (*CYP707A1-A2-A3*), além de evidenciar a necessidade de maior análise da *CYP707A4* para confirmar sua existência. Foi possível observar a homologia com sequências presentes em banco de dados genômico para a espécie, bem como identidade com sequências presentes em bancos de dados de *Fragaria vesca*.

As análises filogenéticas permitiram corroborar a possível diferenciação evolutiva entre as sequências, com seus papéis tecido-específicos no metabolismo da espécie, principalmente quando comparados às sequências com maior homologia presentes nas outras espécies da família das *Rosaceae*s.

Os estudos para silenciamento gênico permitiram a construção de *primers* compatíveis com as sequências e a obtenção parcial dos insertos de interesse, levantando a necessidade de ressíntese dos pares falhos e de montagem *in vitro* dos vetores virais de silenciamento para tratamento *in vivo* das plantas.

Os resultados obtidos, amparados pela literatura existente, corroboram a importância da bioinformática no estudo genômico e na prospecção de alvos gênicos a serem usados em construtos biotecnológicos, possibilitando melhoria das espécies vegetais e atribuição de características adaptativa à realidade emergente no mundo e nas condições de cultivo em alteração pelas mudanças ambientais.

Mais estudos são necessários melhor entendimento do papel dos genes *CYP707A* no metabolismo de *Fragaria ananassa*, sendo sugerida a continuidade com o silenciamento gênico por VIGS iniciado por este trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-NETO, João Braga et al. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. **The FEBS journal**, v. 280, n. 7, p. 1604-1616, 2013.

AFRIN, S. et al. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 22, p. 4435–4449, 2016.

ALEXANDER, L.; GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.2039–2055, 2002

ANTUNES, Luis Eduardo C. et al. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2010.

AYUB, R. A. et al. Absciscic acid involvement on expression of related gene and phytochemicals during ripening in strawberry fruit *Fragaria ananassa* cv. Camino Real. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 178–184, 2016.

BAILE, J. B. Growth, maturation and senescence in fruit. **Science**, v. 146, p. 880-888, 1964.

BURBIDGE, Alan et al. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **The Plant Journal**, v. 17, n. 4, p. 427-431, 1999

BURLA, Bo et al. Vacuolar transport of absciscic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 1446-1458, 2013.

CAI, Yuxiang et al. Characterization and expression analysis of cDNAs encoding absciscic acid 8'-hydroxylase during mulberry fruit maturation and under stress conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 127, n. 1, p. 237-249, 2016.

CARVALHO, R. F. et al. Agroinfiltration of Strawberry Fruit — A Powerful Transient Expression System for Gene Validation. **Current Plant Biology**, v. 6, p. 19–37, 2016.

CHAI, Ye-mao et al. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 14, p. 5079-5089, 2011

CHEN, I.-Ching et al. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 1024-1026, 2011.

CHEN, Jingxin et al. Transcriptome profiling of postharvest strawberry fruit in response to exogenous auxin and absciscic acid. **Planta**, v. 243, n. 1, p. 183-197, 2016.

CHERIAN, Sam; FIGUEROA, Carlos R.; NAIR, Helen. 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 17, p. 4705-4722, 2014.

CHERNYS, Jacqueline T.; ZEEVAART, Jan AD. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. **Plant physiology**, v. 124, n. 1, p. 343-354, 2000.
28

CHITNIS, Vijaya. The role of abscisic acid and its catabolic genes in the regulation of wheat seed dormancy and germination. 2016.

ERKAN, Mustafa; WANG, Shiow Y.; WANG, Chien Y. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 163-171, 2008.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Land and Plant Nutrition Management Service**. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. 2008. Acesso em 9 de janeiro de 2016.

FINKELSTEIN, Ruth. Absciscic acid synthesis and response. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists**, v. 11, 2013.

FU, Da-Qi et al. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. **The Plant Journal**, v. 43, n. 2, p. 299-308, 2005

GIAMPIERI, Francesca et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9-19, 2012.

GIOVANNONI, Jim. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 725-749, 2001.

GOLLDACK, Dortje et al. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 151, 2014.

GONZALEZ, Hugo Carlos Bolzon. **Genes CYP707A em *Fragaria* x *ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico**. 2018. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

HARTUNG, Wolfram; SAUTER, Angela; HOSE, Eleonore. Absciscic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 366, p. 27-32, 2002.

ISMAIL, Ahmed; TAKEDA, Shin; NICK, Peter. Life and death under salt stress: same players, different timing?. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 12, p. 2963-2979, 2014.

IUCHI, Satoshi et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 27, n. 4, p. 325-333, 2001.

JI, Kai et al. Non-climacteric ripening in strawberry fruit is linked to ABA, FaNCED2 and FaCYP707A1. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 4, p. 351-357, 2012.

JIA, Hai-Feng et al. Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. **Plant physiology**, v. 157, n. 1, p. 188-199, 2011.

JIA, H., XIE, Z., WANG, C., SHANGGUAN, L., QIAN, N., CUI, M., LIU, Z., TING ZHENG, T., WANG, M., FANG, J. Absciscic acid, sucrose, and auxin coordinately regulate berry ripening process of the Fujiminori grape. **Funct Integr Genomics**, 2017.

JIA, H.; SHEN, Y. Virus-Induced Gene Silencing. v. 975, p. 211–218, 2013.

JIANG, Fan; HARTUNG, Wolfram. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 1, p. 37-43, 2007.

JIANG, Yueming; JOYCE, Daryl C.; TERRY, Leon A. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, n. 3, p. 227-232, 2001.

JIANG, Yueming; JOYCE, Daryl C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 2, p. 171-174, 2003.

JONES, Alexander M. A new look at stress: abscisic acid patterns and dynamics at high-resolution. **New Phytologist**, v. 210, n. 1, p. 38-44, 2016

JUNG, Sook et al. 15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D1137-D1145, 2019.

KANO, Yasutaka; ASAHIRA, Tadashi. Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawb fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 50, n. 1, p. 31-36, 1981.

KIDD, F., WEST, C., 1927. A Relation Between the Concentration of Oxygen and Carbon Dioxide in th Atmosphere, Rate of Respiration and Length of Storage Life in Apples Research Report to the Grea Dept. Sci. **Food Investment Board**, pp. p41–p45.

KONDO, Satoru et al. Dehydration tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 234-241, 2012.

KUSHIRO, Tetsuo et al. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The EMBO journal**, v. 23, n. 7, p. 1647-1656, 2004.

LARA, I.; VENDRELL, M. Changes in abscisic acid levels, ethylene biosynthesis, and protein patterns during fruit maturation of Granny Smith apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 2, p. 183-189, 2000.

LEE, Kwang Hee et al. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1109-1120, 2006.

LENG, Ping; YUAN, Bing; GUO, Yangdong. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4577-4588, 2013.

LI, Chunli et al. Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: a model for non-climacteric fruit ripening. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1950-1953, 2011.

LI, Q.; JI, K.; SUN, Y.; LUO, H.; WANG, H.; LENG, P. The role of FaBG3 in fruit ripening and B. cinerea fungal infection of strawberry. **The Plant Journal**. V. 76, 1. p. 24-35, 2013.

LI, D.; LI, L. LUO, Z. MOU, W.; MAO, L. YING, T Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Influence of Abscisic Acid on the Metabolism of Pigments, Ascorbic Acid and Folic Acid during Strawberry Fruit Ripening. **Plos One**. Jun. 2015.

LIAO, Xiong et al. Interlinked regulatory loops of ABA catabolism and biosynthesis coordinate fruit growth and ripening in woodland strawberry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 49, p. E11542-E11550, 2018.

MAINARDI, J. A.; PURGATTO, E.; VIEIRA JUNIOR, A.; BASTOS, W. A.; CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. The effects of ethylene and 1-MCP on gene expression and activity profile of alpha-1,4-glucan phosphorylase during banana ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7294-7299, 2006.

MANNING, K. Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. **Planta**, v. 194, n. 1, p. 62-68, 1994.

NAMBARA, E.; AND MARION-POLL, A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**. v.56, p. 165–185, 2005.

NAMBARA, Eiji et al. Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, v. 20, n. 2, p. 55-67, 2010.

PADULA, Maria Carmela et al. Cultivar based selection and genetic analysis of strawberry fruits with high levels of health promoting compounds. **Food chemistry**, v. 140, n. 4, p. 639-646, 2013

PERKINS-VEAZIE P. Growth and ripening of strawberry fruit. **Horticultural Reviews**. 17, p. 267–297, 1995.

PINELI, Livia de L. de O. et al. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 11-16, 2011.

REN, Jie et al. Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8'-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 17, p. 1486-1493, 2010.

ROCHA, Talita Orrico. Compostos bioativos e qualidade microbiológica de morangos" oso grande" produzidos em sistemas de cultivo orgânico e convencional. 2011

RODRIGO, María-Jesús; ALQUEZAR, Berta; ZACARÍAS, Lorenzo. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 633-643, 2006.

SAH, Saroj K.; REDDY, Kambham R.; LI, Jiaxu. Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 571, 2016.

SAITO, Shigeki et al. Arabidopsis CYP707As encode (+)-absciscic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of absciscic acid. **Plant physiology**, v. 134, n. 4, p. 1439-1449, 2004.

SCHAART, Jan 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.

SEILER, Christiane et al. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 8, p. 2615-2632, 2011.

SEO, Mitsunori; KOSHIBA, Tomokazu. Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. **Journal of plant research**, v. 124, n. 4, p. 501-507, 2011.

SETHA, Sutthiwal et al. Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. **Plant growth regulation**, v. 45, n. 3, p. 183-188, 2005.

SOTO, Alvaro et al. ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening-and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 64, p. 11-24, 2013.

SUN, J. K. et al. Influence of salt stress on ecophysiological parameters of *Periploca sepium* Bunge. **Plant, Soil and Environment**, v. 57, n. 4, p. 139-144, 2011.

SUN, Jing-Hua et al. New evidence for the role of ethylene in strawberry fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 3, p. 461-470, 2013

SYMONS, G. M. et al. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 13, p. 4741-4750, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed Porto alegre: Artmed, 2017.

TAN, Bao Cai et al. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 22, p. 12235-12240, 1997.

THOMPSON, Andrew J. et al. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. **The Plant Journal**, v. 23, n. 3, p. 363-374, 2000.

TIAN, Ji et al. Tobacco rattle virus mediated gene silencing in strawberry plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 1131-1138, 2015.

TIKUNOV, Yury M. et al. Non-smoky glycosyltransferase1 prevents the release of smoky aroma from tomato fruit. **The Plant Cell**, v. 25, n. 8, p. 3067-3078, 2013.

TUNG, Swee Ang et al. Over-expression of LeNCED1 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbcS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 7, p. 968-981, 2008.

VANDENDRIESSCHE, Thomas et al. Effect of ripening and inter-cultivar differences on strawberry quality. **LWT-Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 62-70, 2013.

VIGHI, I. L.; CRIZEL, R. L.; PERIN, E. C.; ROMBALDI, C. V.; GALLI, V. Crosstalk During Fruit Ripening and Stress Response Among Abscisic Acid, Calcium- Dependent Protein Kinase and Phenylpropanoid. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.38, p. 99-116, 2019.

WHEELER, S.; LOVEYS, B.; FORD, C.; DAVIES, C. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, p. 195–204, 2009.

XU, Zheng-Yi et al. A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 24, n. 5, p. 2184-2199, 2012.

ZHANG, Mei et al. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 12, p. 1241-1252, 2009.

ZHANG, Mei; YUAN, Bing; LENG, Ping. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1579-1588, 2009.

ZHENG, Yan et al. Identification and expression analysis of the *Glycine max* CYP707A gene family in response to drought and salt stresses. **Annals of botany**, v. 110, n. 3, p. 743-756, 2012.

ZHU, Guohui et al. Involvement of the abscisic acid catabolic gene CYP707A2 in the glucose-induced delay in seed germination and post-germination growth of *Arabidopsis*. **Physiologia Plantarum**, v. 143, n. 4, p. 375-384, 2011.

9 ANEXOS

9.1 Sequências FASTA – CYP707A *Fragaria ananassa*

As sequências correspondentes as CYP707A de *Fragaria ananassa* estão apresentadas a seguir no formato FASTA.

>CYP707A1

```
ATGGTAGCGATTTTTCACATACGTTTTTCGTTTCTCTTTTAACCCTTATCTTCTCGTACATTTTCAC
GAAGAAGAGCAAGGGAGGAGGAGAAGAAGACCCCCATGATGATCATGGTCATAAGAATAGGGCTG
CTCAGCTCCCTCCAGGTTCATTTGGTTGGCCTTATATCGGTGAAACTCTTCAGCTCTATTCTCAG
GACCCAAACACTTTTCTTCTCTTCCAGACAGAAAAGGTATGGGAAAATTTTTAAGACGCATATACT
TGGGTCTCCATGTGTGATGCTGGCGAGCCCGGAGGCTGCAAAGTTTGTGTTGGTCACTCAAGCTC
ACTTGTTCAAGCCCACCTATCCCAAAGCAAAGAGGCTCTGATTGGTCCCTCCGCATTATTTTTTC
CACCATGGAGATTACCATTTTCAGACTGAAGAAGCTTGATCAGCGATCTCTCAGTCCTGATGCTAT
TCGGAATTTGGTGCCCCATATCAACGCCACAGCTGCCTCTGTGACCTCGGAGTCGTGGGGCACCG
GGAAAGTCATCAACACCTTCCATGAGATGAAGAAGTTTTCTTTCGAAATTGGTATACTAGTAATT
TTTGGCCAATTGGAGACCCGCTACAAAGAAGAACTGAGGAAAAACTATATGGCAGTGAACAAAGG
CTACAATTCATTTCCCATAAACATTCTTGGAACGCCATACAAAAGGCTTTGTTGGCGAGGGAGA
GGCTGAGGAACATTATCGGTGACATAATCCATGAGAGAAAGGAGAAGAGGTTACCTGAAAAGGAT
CTGTTGGGTTGTTTGCTGAGCTCAATAAACGAAGGAGGGGAAGTTTTGAGTGATGACCAAATCGC
AGACAACATAATAGGTGTTCTCTTTGCTGCACAAGACACCACAGCCAGTGTGATGACCTGGATTT
TCAAGTACCTCCATGACGAGCCAAAAATCATAGAAGCTGTTAAGGCCGAACAAAATGCAATTCGC
ATATCAAATGAACAAGCAGGTAACCAACCATTGAGTTGGGCAGACACCAGAAACATGCCAATTAG
TTACAAGGTTGTGTTGGAGAGTTTGAGACTGTCAAGCATTATATCGTTCCTTTTTTCGAGAAGCTG
TGTTTGATGTGGAGTACAAAGGTTACTTGATTCCAAAAGGTTGGAAGGTGATGCCTTTGTTTCAGG
AACATTCATCATAATCCTGAATTCTTCGCCGACCCTCAGAAATTCGATCTTTCTAGATTTCGAGGT
TGCACCAAAGCCAAATACATTTATGCCATTTGGCAGTGGAGTCCATGCTTGTCCAGGAAACGAGC
TTGCTAAGCTGGAATTACTGATTATGATCCACCATTTAGTCACCAATTTTCAGGTGGGAAATTGAG
GGATCCCAAAGCGGGACTGAGTATAGTCCATTTCTGTACCTCTGAATGGACTTCCAGTCAAAC
TTGGAAATTAGAATAG
```

>CYP707A2

ATGGTAGCGATTTTCACATACGTTTTCGTTTTCTCTTTTAACCCTTATCTTCTCGTACATTTTCAC
GAAGAAGAGCAAGGGAGGAGGAGAAGAAGACCCCCATGATGATCATGGTCATAAGAATAGGGCTG
CTCAGCTCCCTCCAGGTTCATTTGGTTGGCCTTATATCGGTGAAACTCTTCAGCTCTATTCTCAG
GACCCAAACACTTTCTTCTCTTCCAGACAGAAAAGGTATGGGAAAATTTTTAAGACGCATATACT
TGGGTCTCCATGTGTGATGCTGGCGAGCCCGAGGCTGCAAAGTTTGTGTTGGTCACTCAAGCTC
ACTTGTTCAAGCCCACCTATCCCAAAGCAAAGAGGCTCTGATTGGTCCCTCCGCATTATTTTTC
CACCATGGAGATTACCATTTTCAGACTGAAGAAGCTTGATCAGCGATCTCTCAGTCCTGATGCTAT
TCGGAATTTGGTGCCCCATATCAACGCCACAGCTGCCTCTGTGACCTCGGAGTCGTGGGGCACCG
GGAAAGTCATCAACACCTTCCATGAGATGAAGAAGGCGAGGGAGAGGCTGAGGAACATTATCGGT
GACATAATCCATGAGAGAAAGGAGAAGAGGTTACCTGAAAAGGATCTGTTGGGTGTTTGTCTGAG
CTCAATAAACGAAGGAGGGGAAGTTTTGAGTGATGACCAAATCGCAGACAACATAATAGGTGTTT
TCTTTGCTGCACAAGACACCACAGCCAGTGTCATGACCTGGATTTTCAAGTACCTCCATGACGAG
CCAAAAATCATAGAAGCTGTTAAGGCCGAACAAAATGCAATTCGCATATCAAATGAACAAGCAGG
TAACCAACCATTGAGTTGGGCAGACACCAGAAACATGCCAATTAGTTACAAGGTTGTGTTGGAGA
GTTTGAGACTGTCAAGCATTATATCGTTCCTTTTTTCGAGAAGCTGTGGTTGATGTGGAGTACAAA
GGTTACTTGATTCCAAAAGGTTGGAAGGTGATGCCTTTGTTTCAGGAACATTCATCATAATCCTGA
ATTCTTCGCCGACCCTCAGAAATTCGATCTTCTAGATTCGAGGTTGCACCAAAGCCAAATACAT
TTATGCCATTTGGCAGTGGAGTCCATGCTTGTCCAGGAAACGAGCTTGCTAAGCTGGAATTACTG
ATTATGATCCACCATTTAGTCACCAATTTTCAGGTGGGAAATTGAGGGATCCCAAAGCGGGACTGA
GTATAGTCCATTTCTGTACCTCTGAATGGACTTCCAGTCAAACCTTTGGAAATTAGAA

>CYP707A3

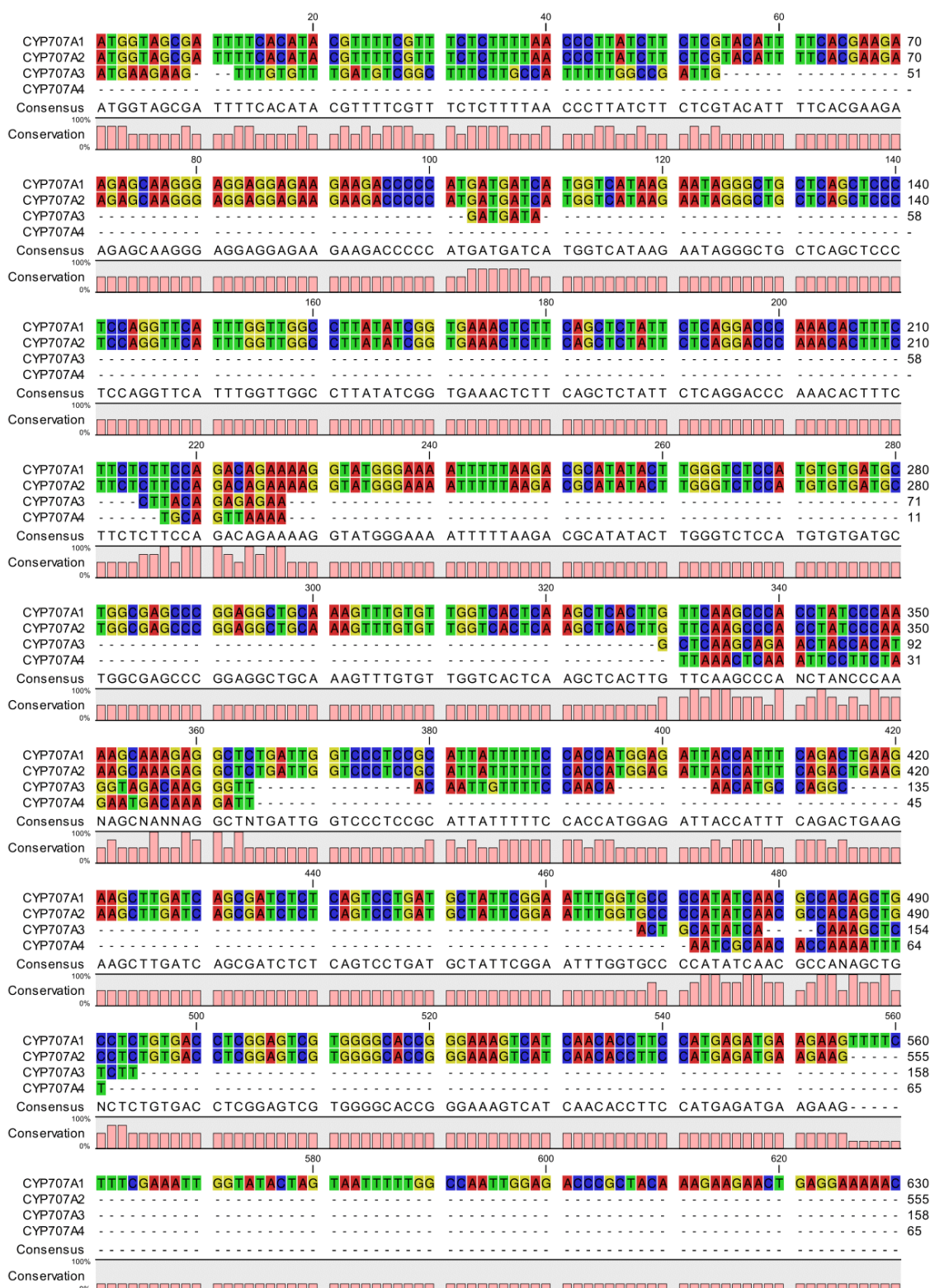
ATGAAGAAGTTTGTGTTTGATGTCGGCTTTCTTGCCATTTTTGGCCGATTGGATGATACTTACAG
AGAGAAGCTCAAGCAGAACTACCACATGGTAGACAAGGGTTACAATTGTTTTCCAACAAACATGC
CAGGCACTGCATATCACAAAGCTCTCTTGGCGAGGAAAAGGCTTAGTCAGATTCTGAGGCAGATA
ATTTCTGAGAGGAAGGAAAAGAAAGTACTGCAGAAAGATCTCTTGGGTGATTGCTGAACTTTCA
AAATGAAAAGGGGCAAACTTAAGCGAGGATCAAATTTCCGATAACATCATTGGAGTGCTGTTTG
CAGCCCAAGACACTACAGCTAGTGTTCTAACATGGATTCTGAAGTACCTCCATGATAACCAAAAC
ATTCTTGAAGCTGTGAATGCTGAGCAGAAGGCAATATGTGATGCAAATGATGGGTGTAAGAGATC
ATTGACATGGGCACAAATCAGAAATATGCCGCTTACACATAGAGTTATATTAGAGAGTTTGAGGA
TGGCCAGCATCATATCTTTTCGCATTTAGGGAAGCTGTGGTTGATGTTGAATACAAAGGATATCTC
ATACCAAAGGGTTGGAAGGTCATGCCATTGTTTAGGAACATACATCATAATCCTGAGTTCTTCTC
TGCTCCTCAAATTTTGATCCATCTAGGTTTGAGGTTGCTCCAAAGGCTTATACTTTTCATACCAT
TTGGCAAAGGAGTACATGCTTGTCTTGAAATGAGCTTGCCAAACTGGAGATGTTCATTTTGATC
CACCATCTCGTGACTAGTTTCCGATGGGAAGTAGTGGGATCACAAAGTGGGATTCAATAT

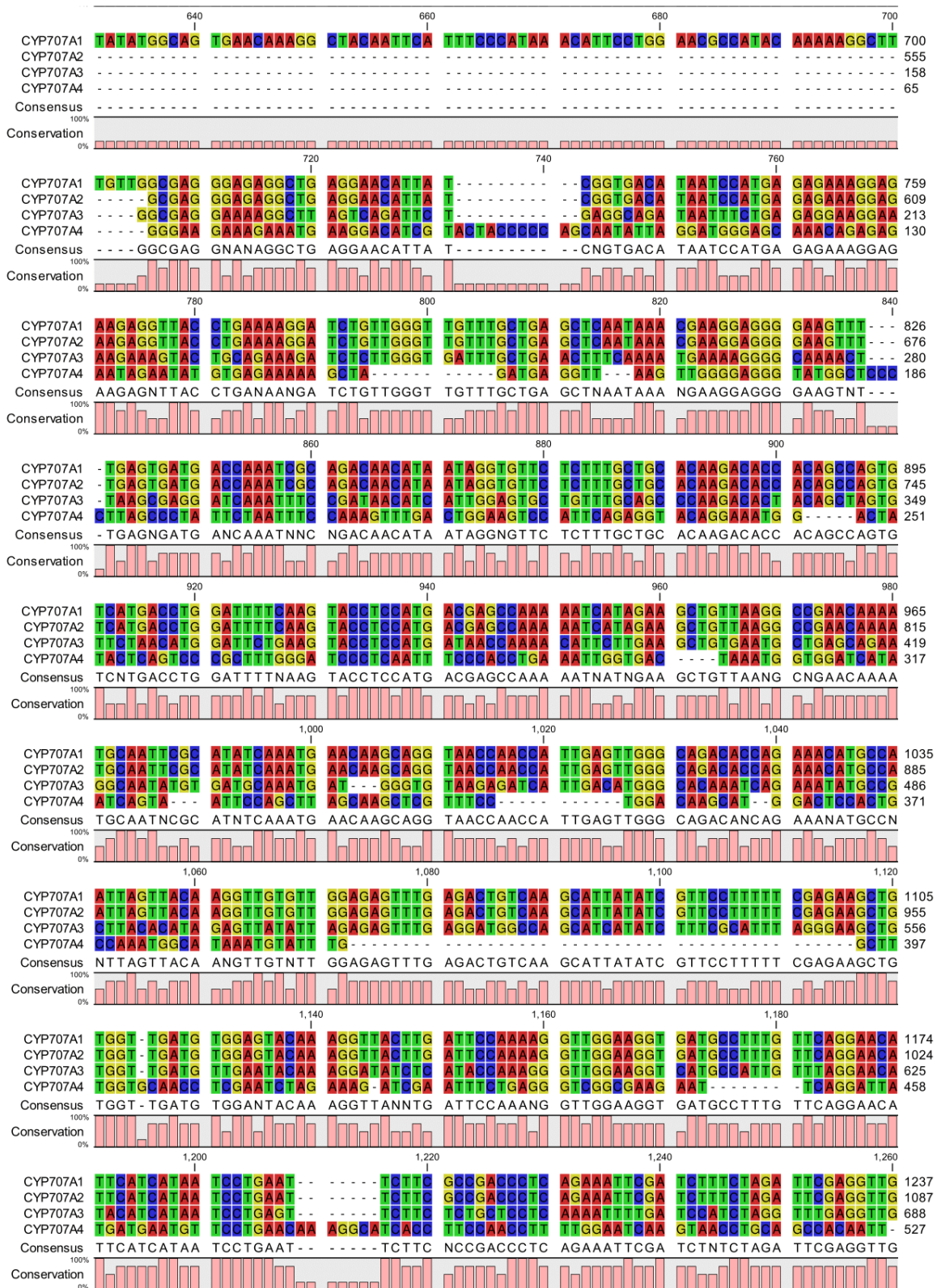
>CYP707A4

TGCAGTTAAAATTAAACTCAAATTCCTTCTAGAATGACAAAGATTAATCGCAACACCAAAATTTT
GGGAAGAAAGAAATGAAGGACATCGTACTACCCCCAGCAATATTAGGATGGGAGCAAACAGAGAG
AATAGAATATGTGAGAAAAAGCTAGATGAGGTTAAGTTGGGGAGGGTATGGCTCCCCCTTAGCCCT
ATTCTAATTTCCAAAGTTTGACTGGAAGTCCATTTCAGAGGTACAGGAAATGGACTATACTCAGTC
CCGCTTTGGGATCCCTCAATTTCCCACCTGAAATTGGTGACTAAATGGTGGATCATAATCAGTAA
TTCCAGCTTAGCAAGCTCGTTTCCTGGACAAGCATGGACTCCACTGCCAAATGGCATAAATGTAT
TTGGCTTTGGTGCAACCTCGAATCTAGAAAGATCGAATTTCTGAGGGTCGGCGAAGAATTCAGGA
TTATGATGAATGTTCTGAACAAAGGCATCACCTTCCAACCTTTTGAATCAAGTAACCTGCAGC
CACAATTTCCAAAGACCAATCATACTTCTACACCTCATTTTTTTTTCTCTTGCTGGTACAAAATA
ATGCATTCTTGCTAATTCTGGGAATCGTCATTGCAGTGATCATTAGTCTTGGAACACAACAACAG
TAG

9.2 Alinhamento das sequências CYP707A

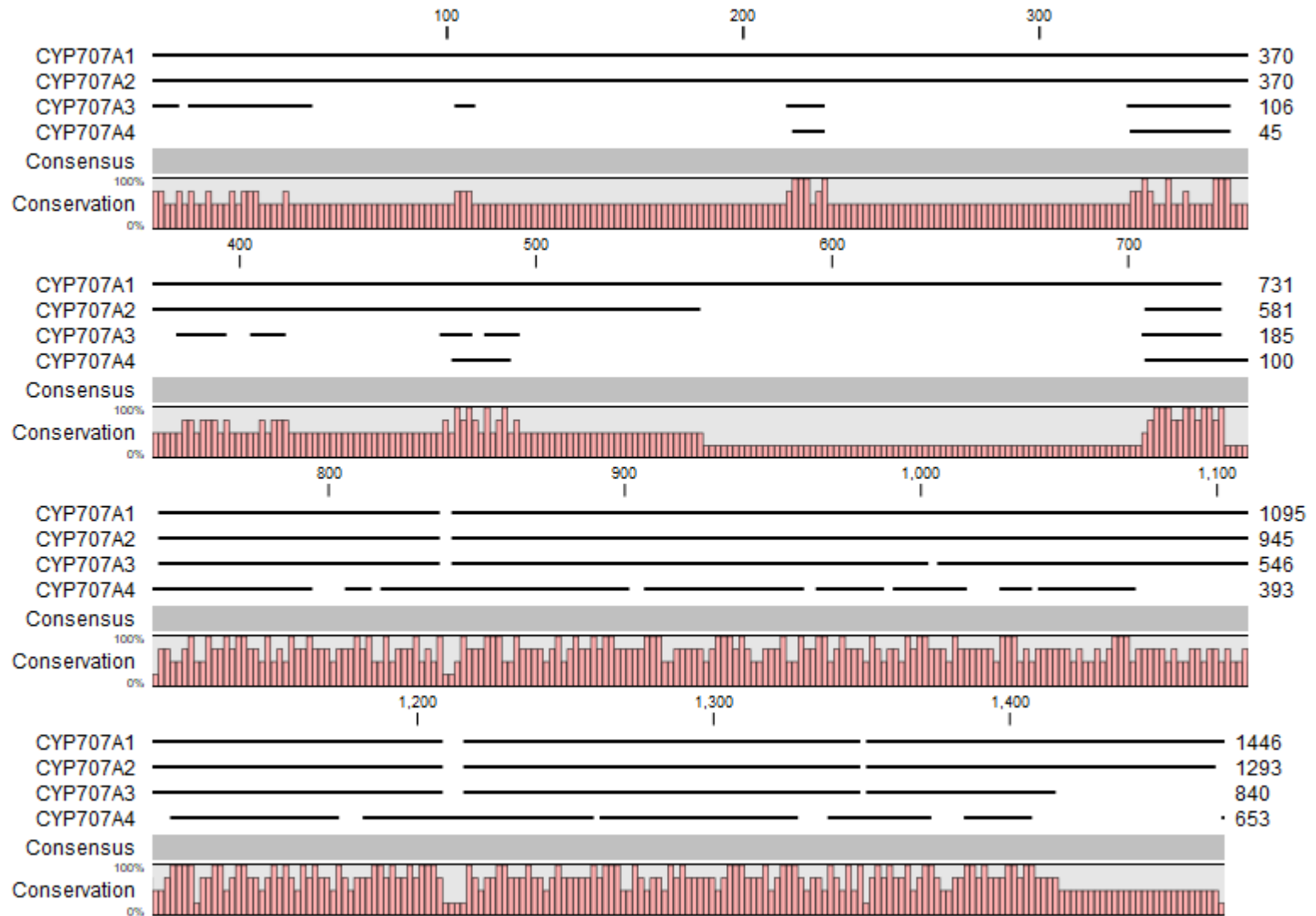
9.2.1 Alinhamento das sequências CYP707A base a base





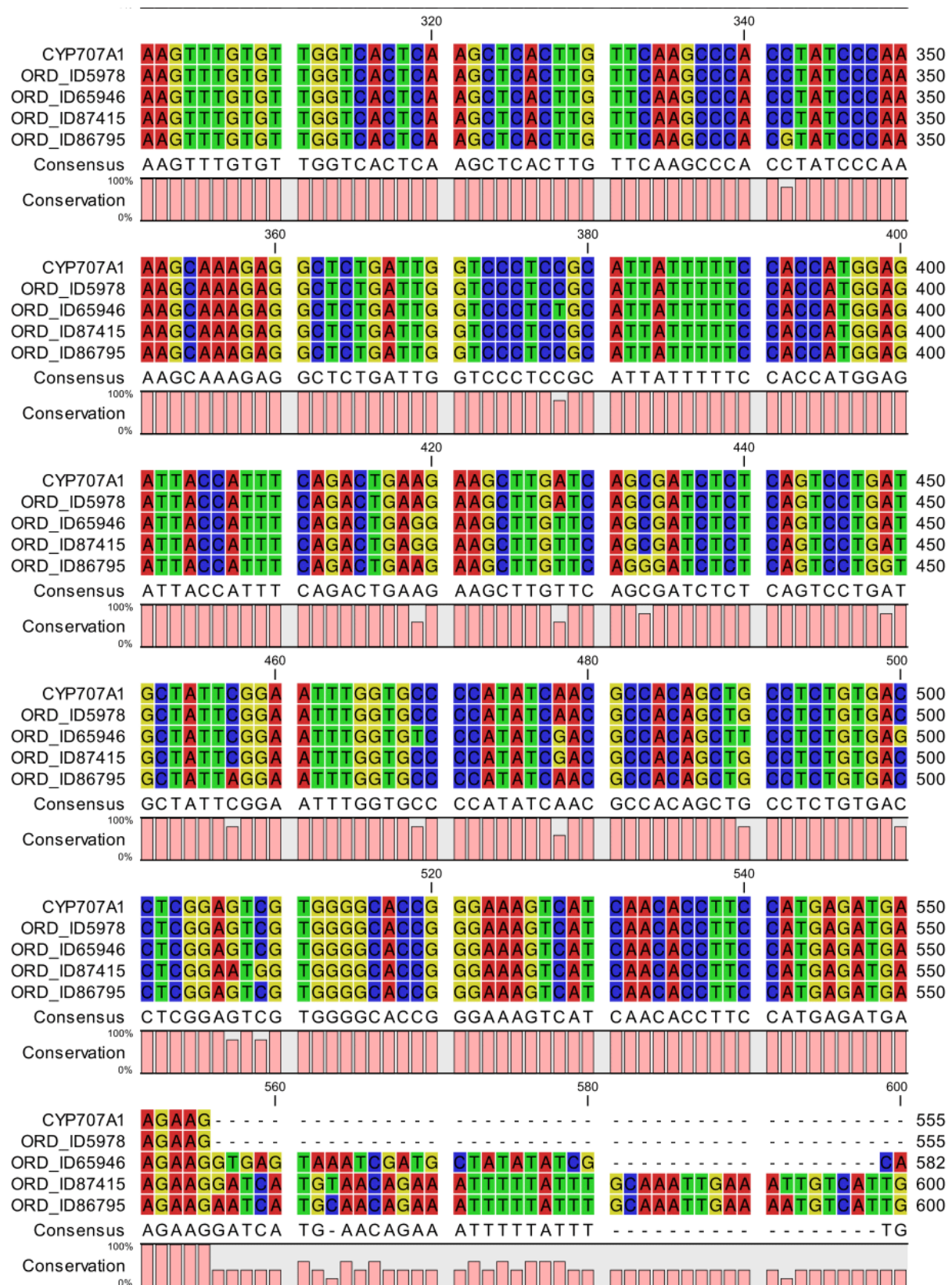
9.2.2 Alinhamento das CYP707A (representação gráfica)

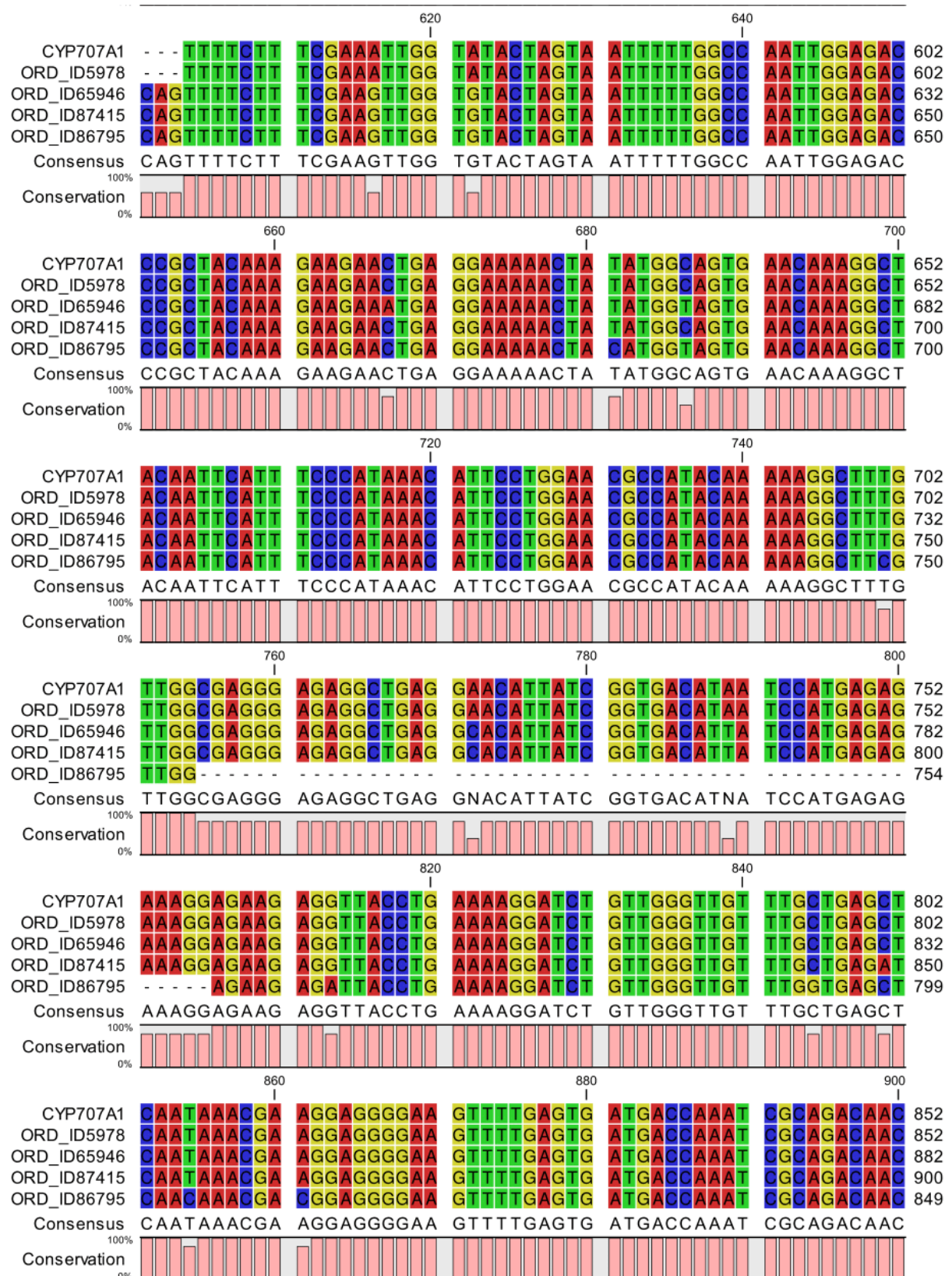
Representações gráficas dos alinhamentos das sequências CYP707A, presentes em transcriptoma de *Fragaria ananassa*

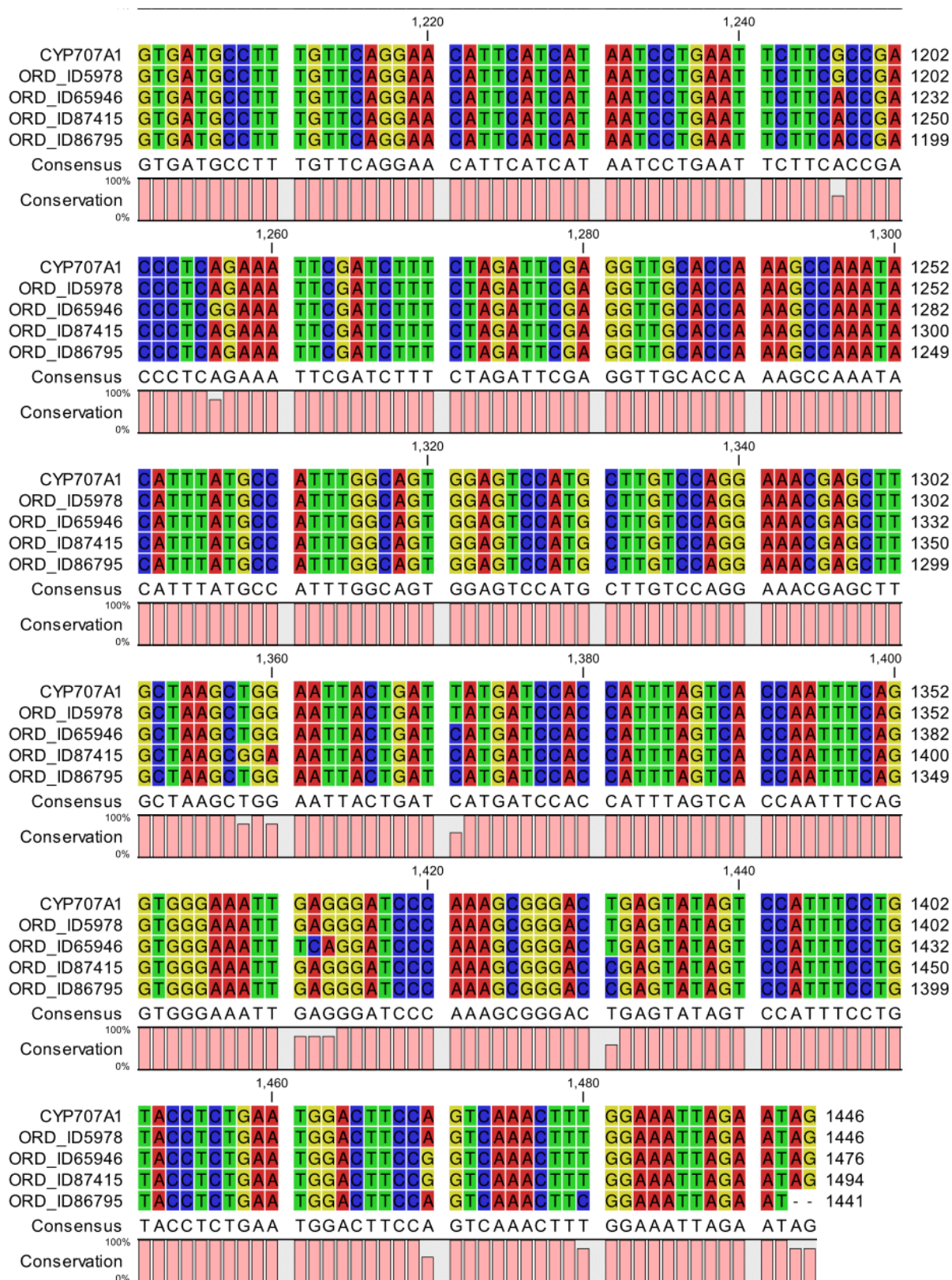


9.3.1 Alinhamento da sequência CYP707A1 com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base

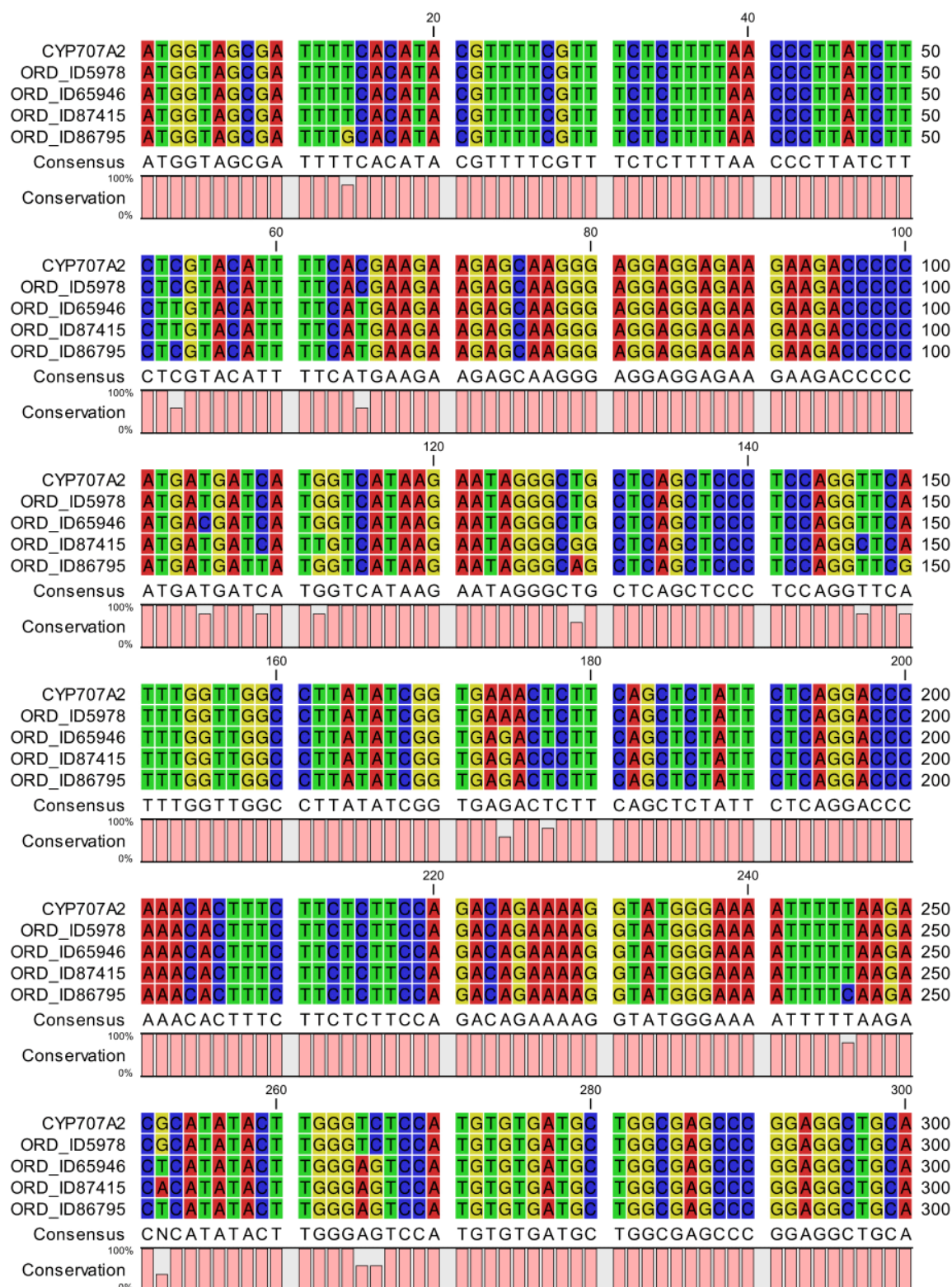


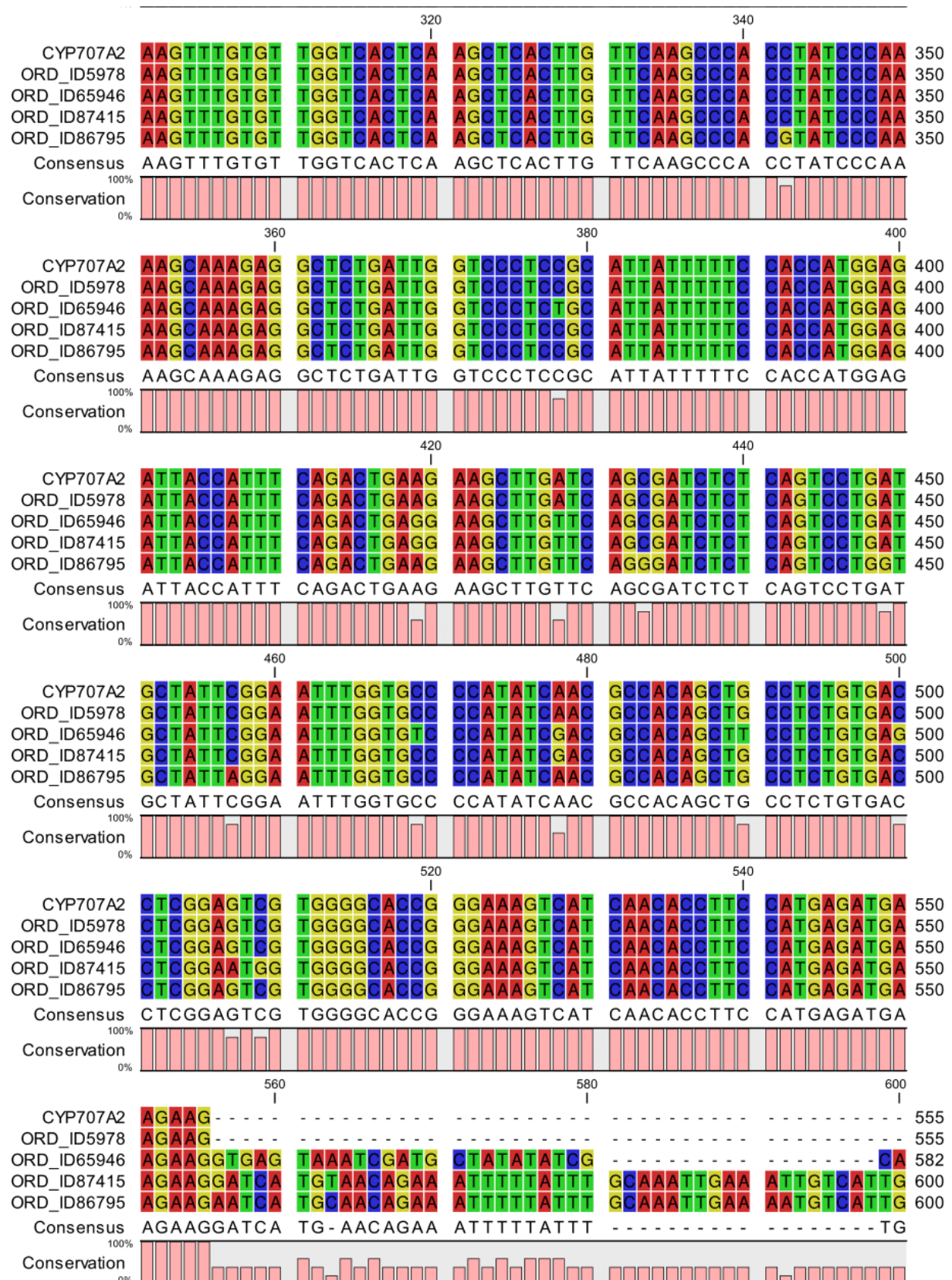


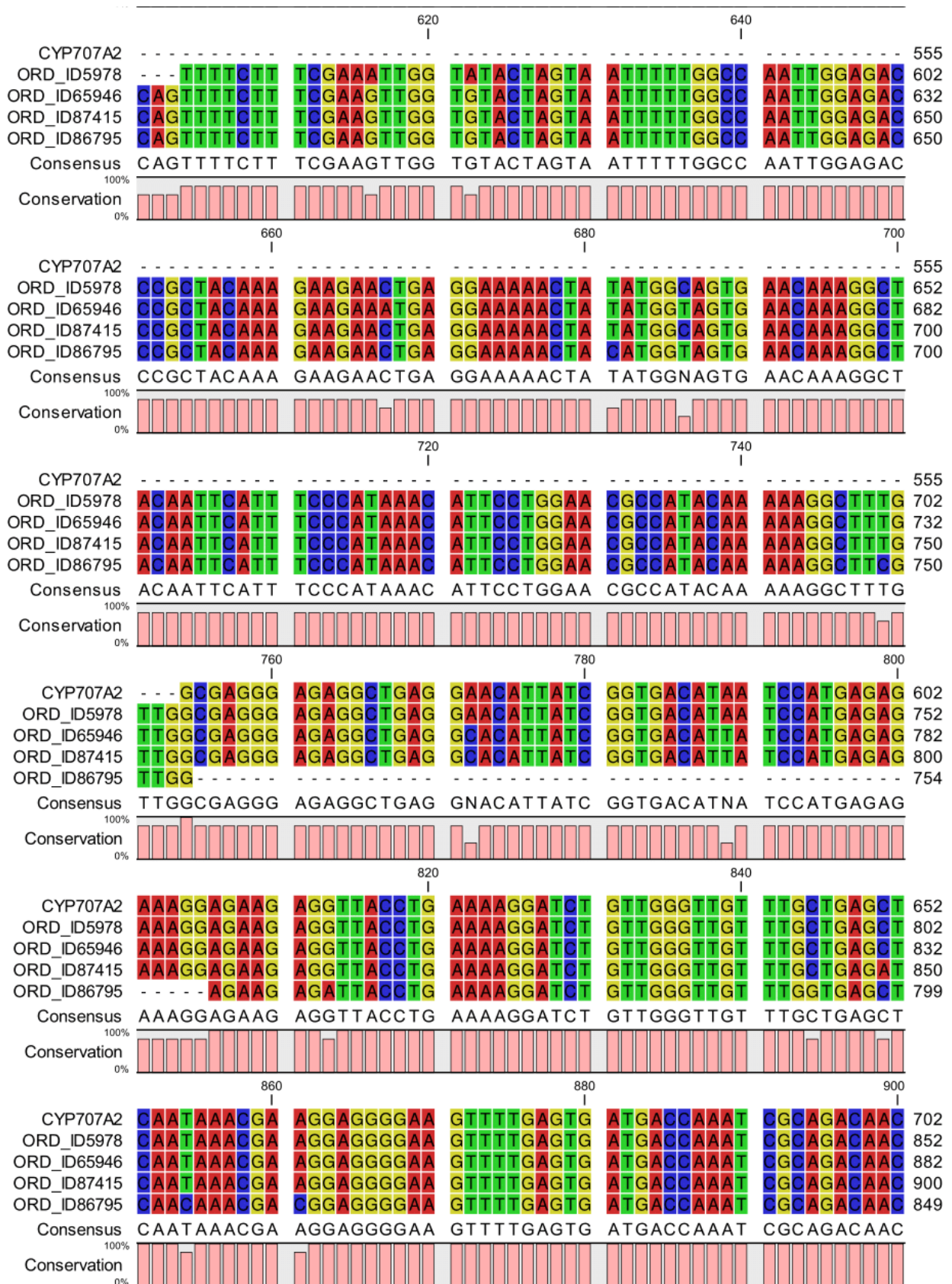


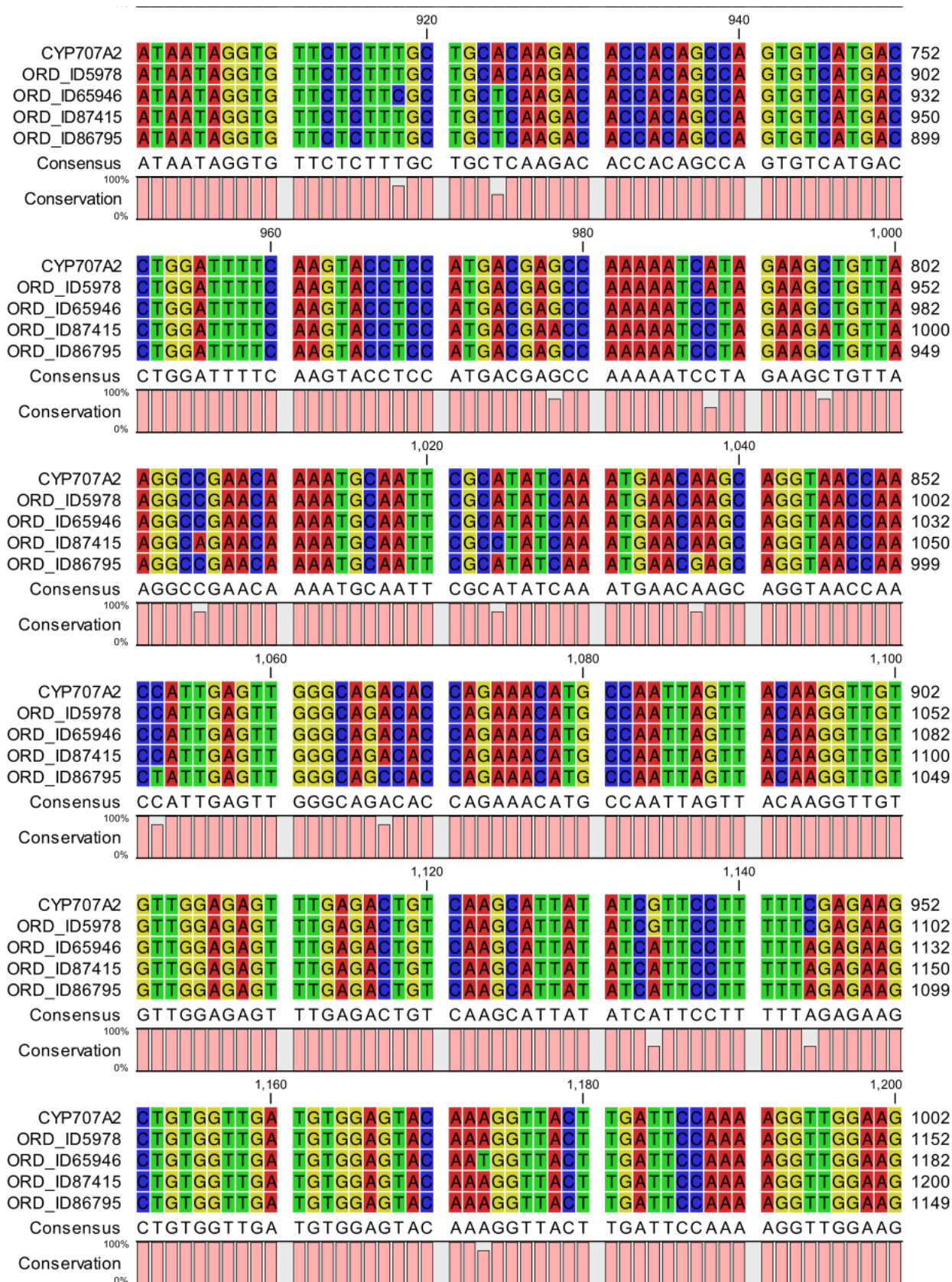


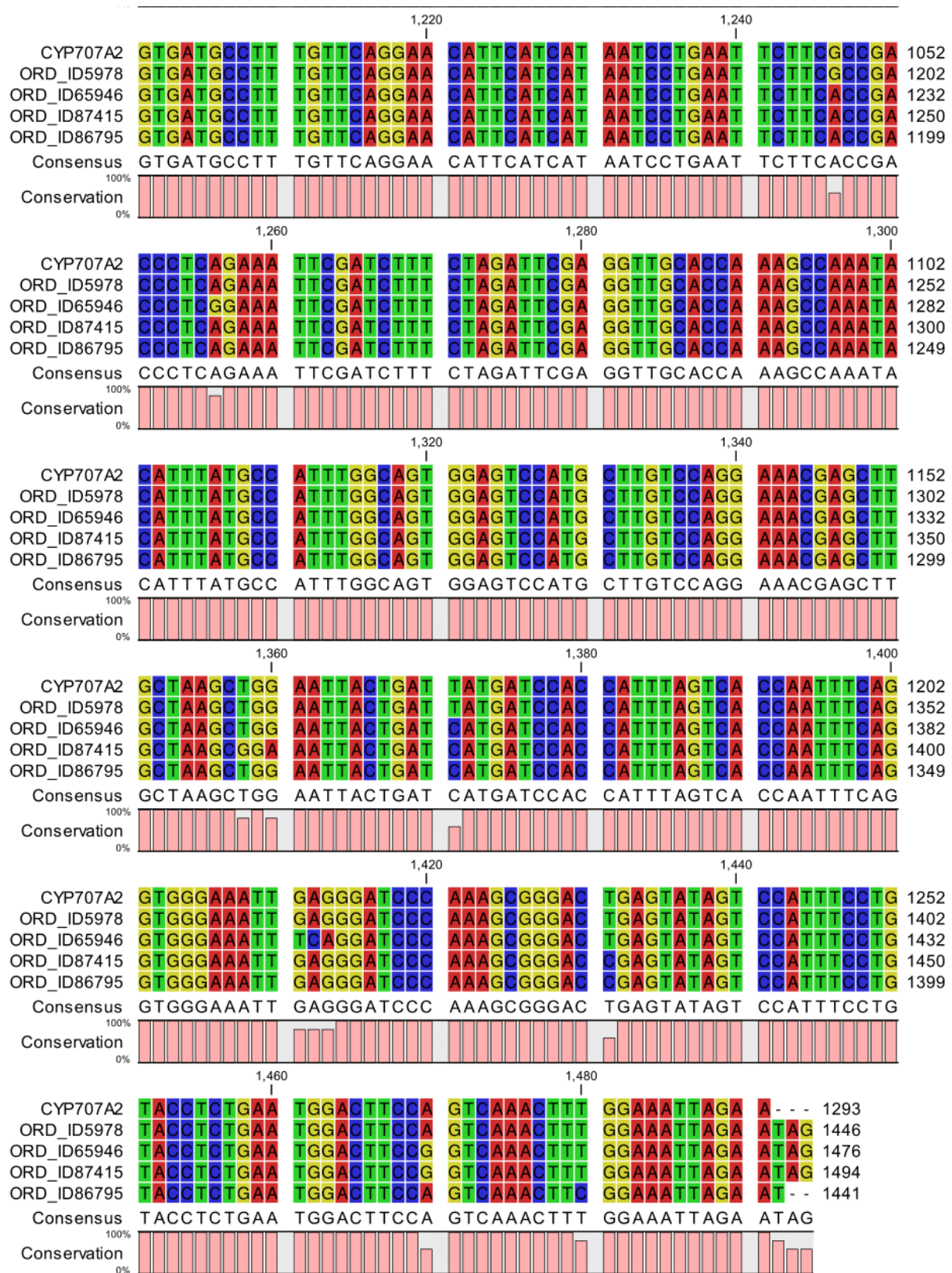
9.3.2 Alinhamento da sequência *CYP707A2* com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.



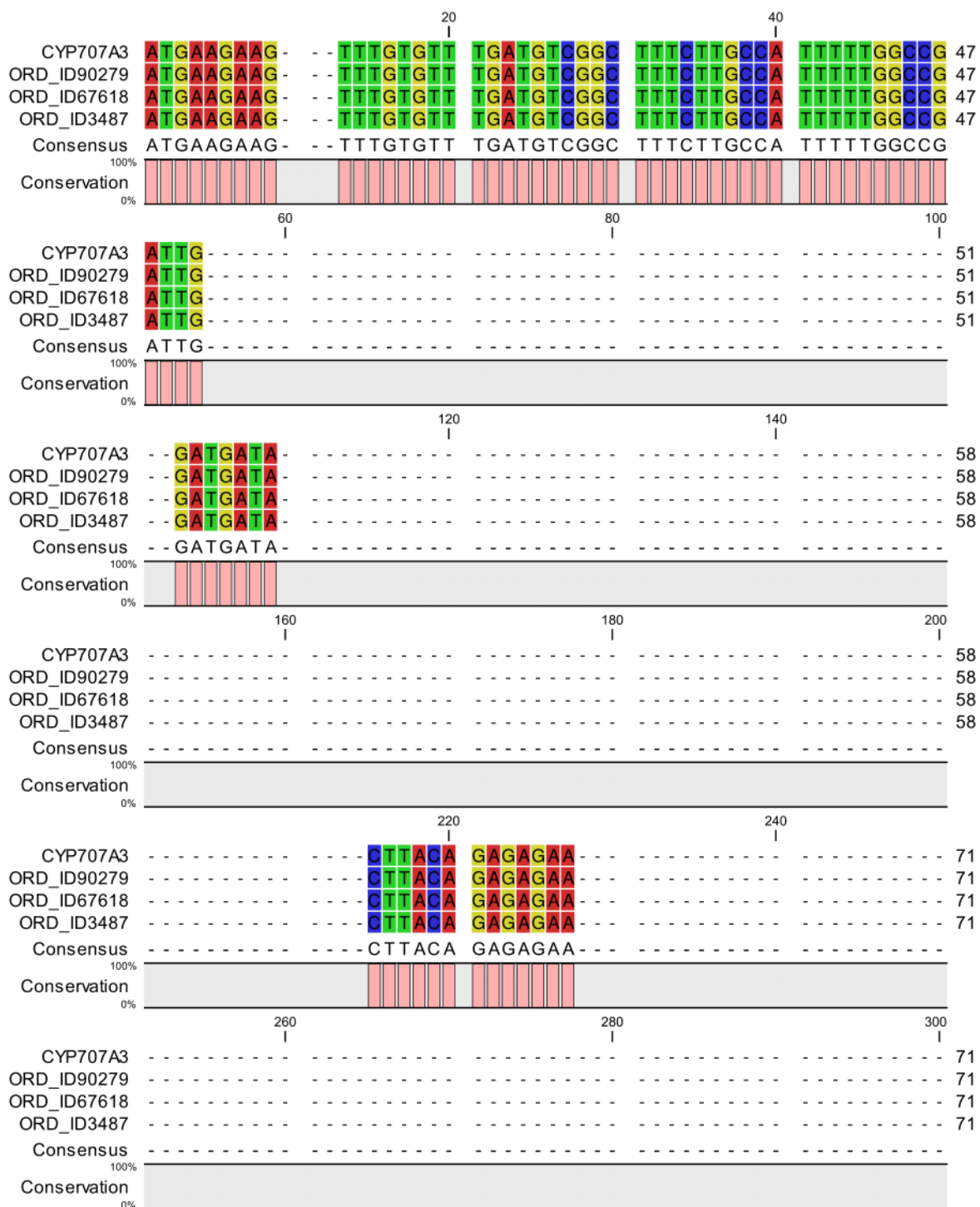


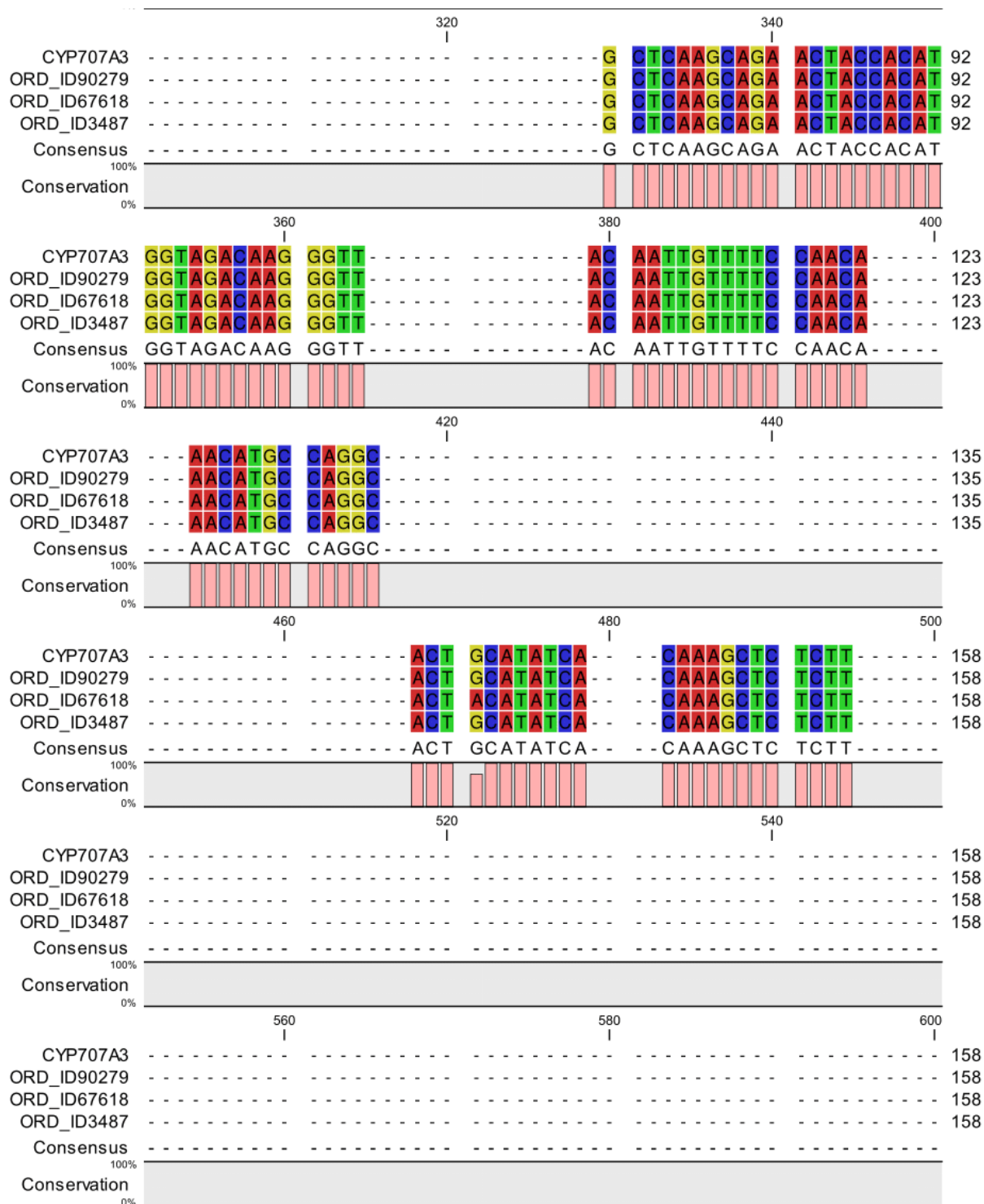


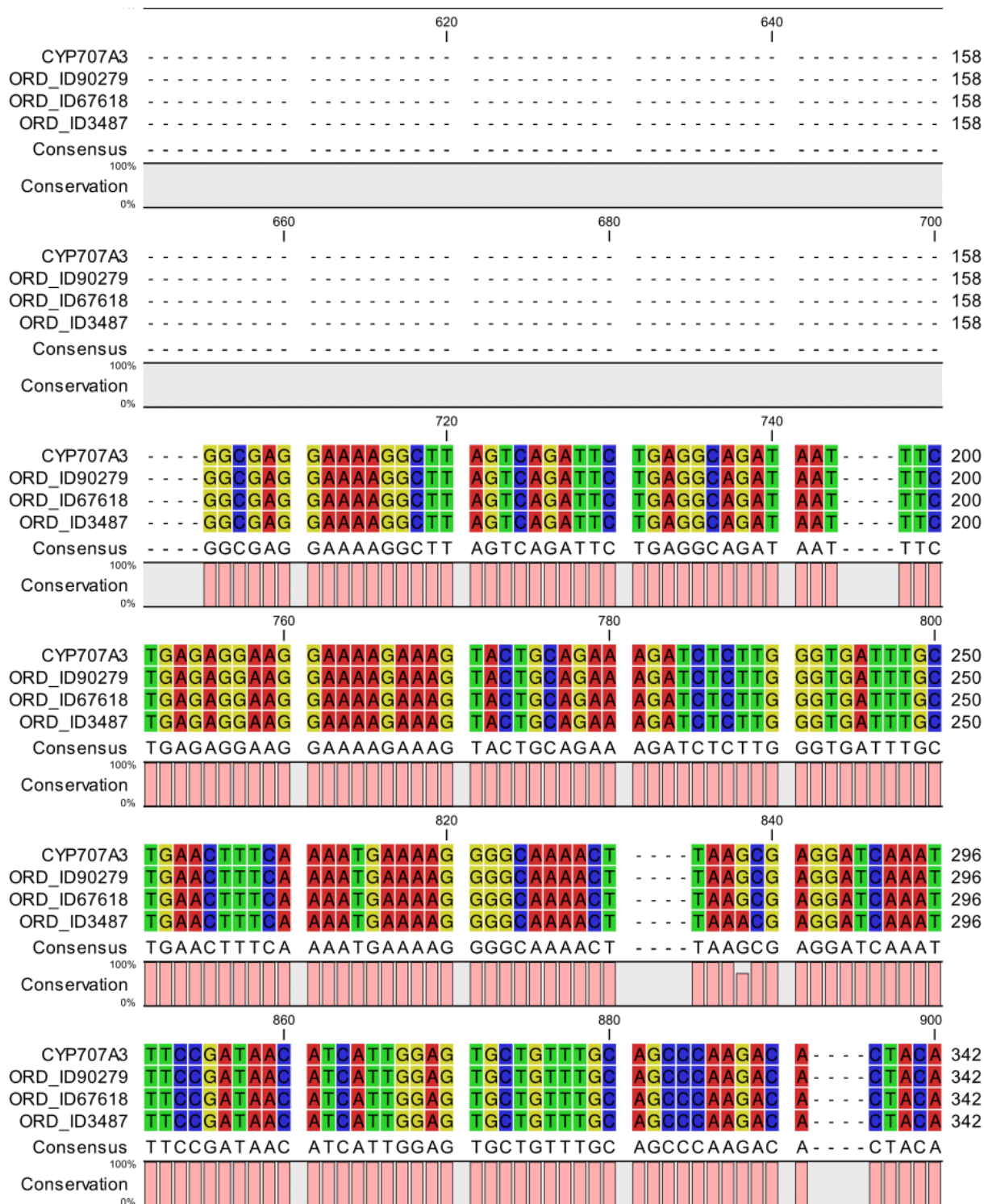


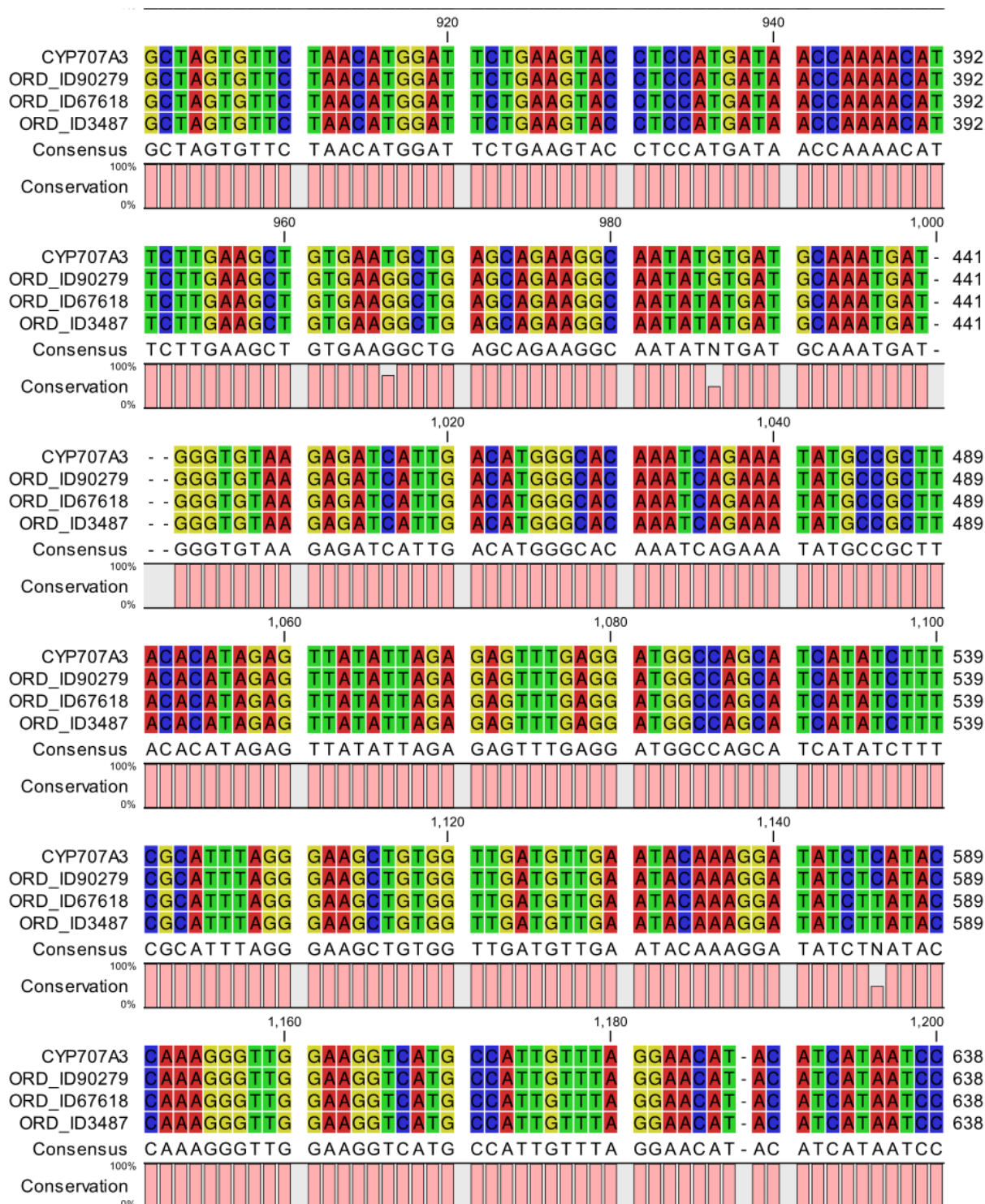


9.3.3 Alinhamento da sequência *CYP707A3* com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.

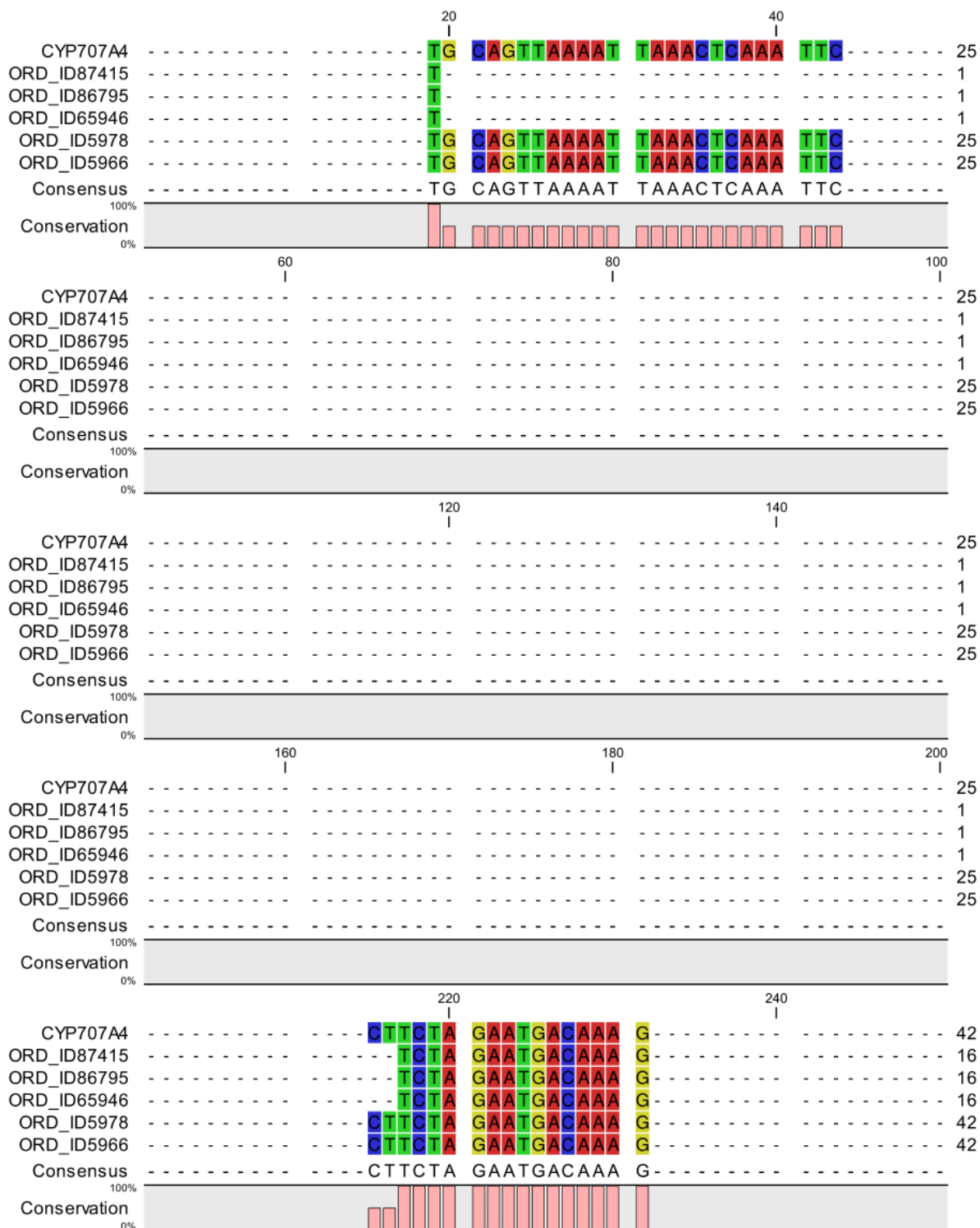


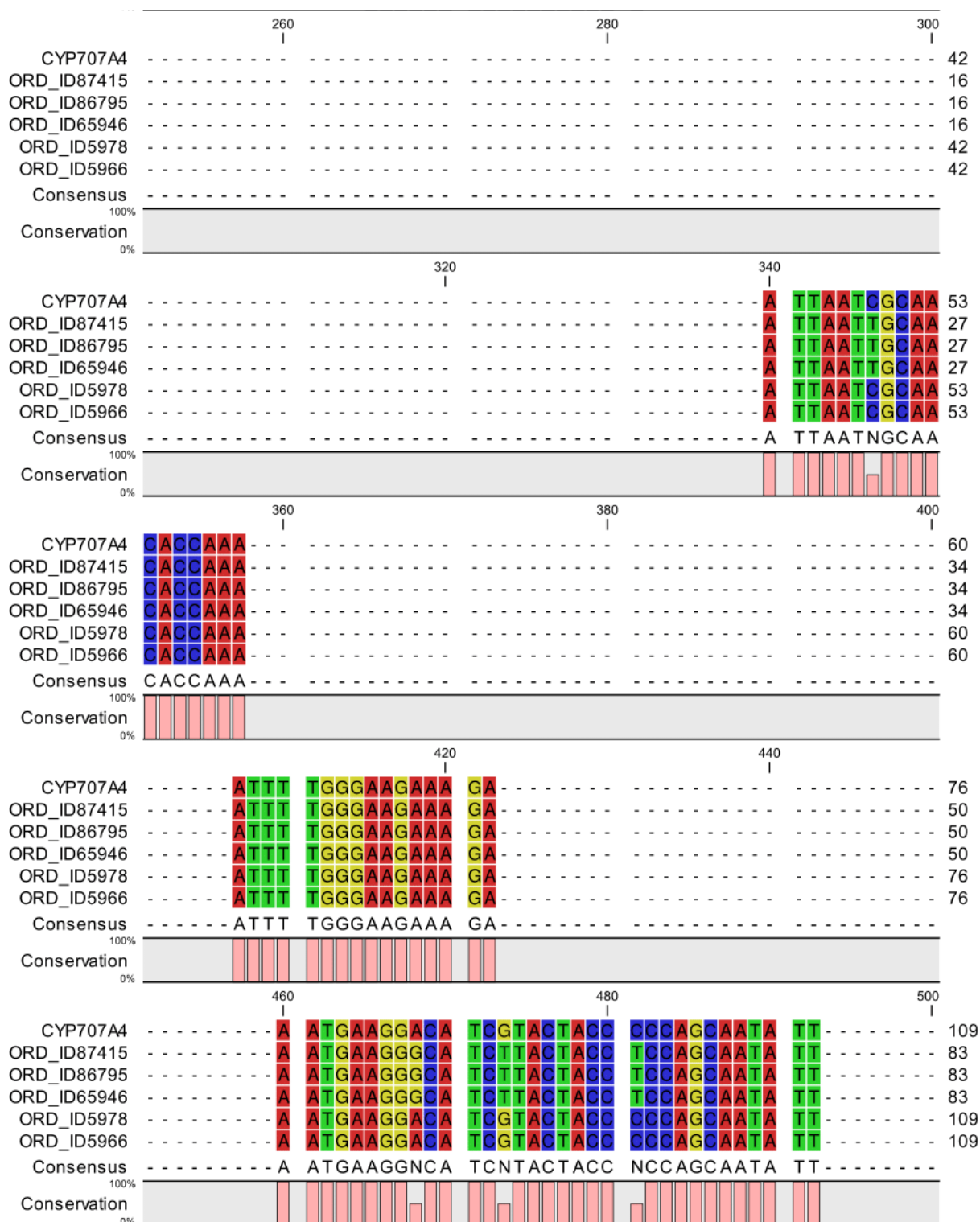


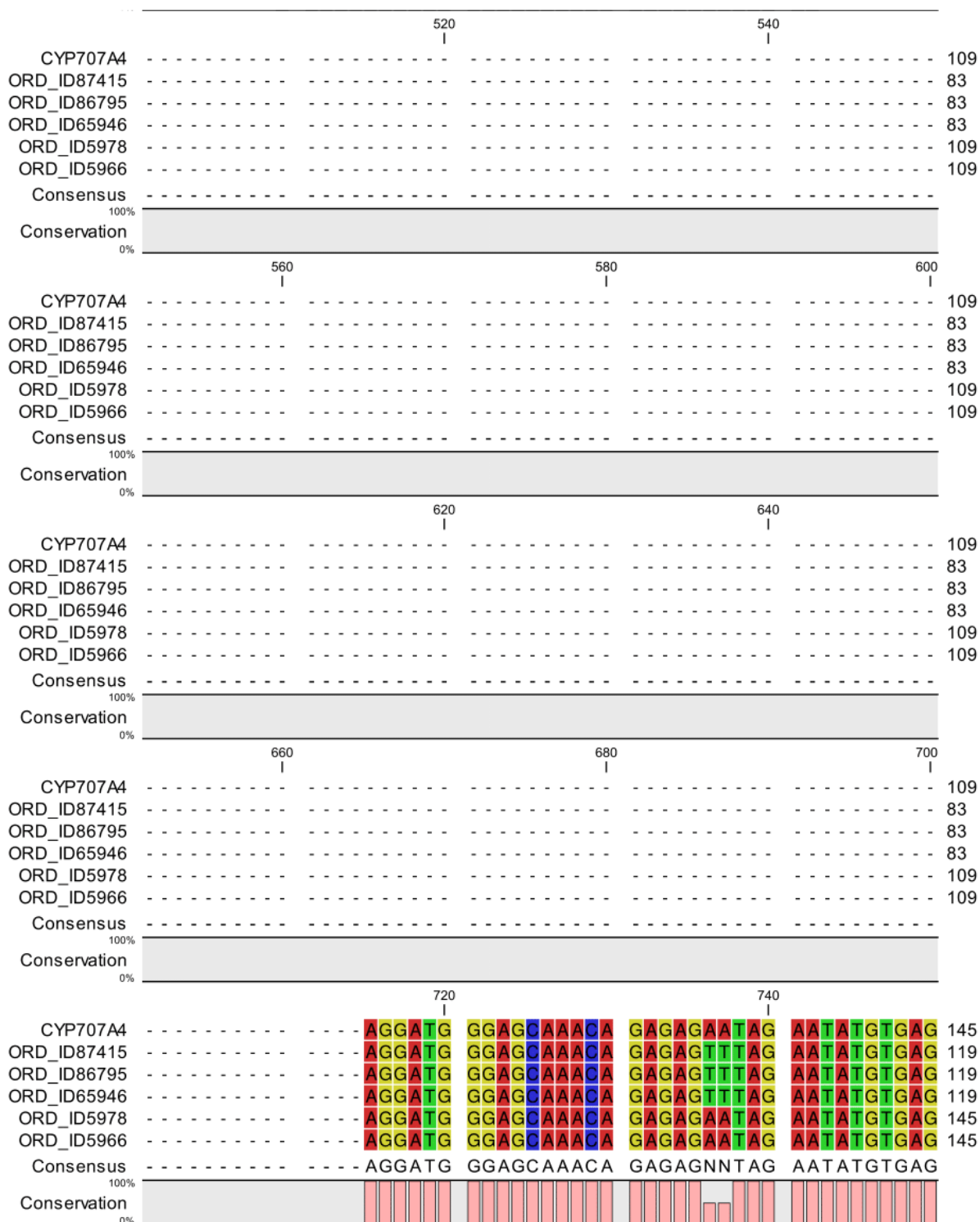


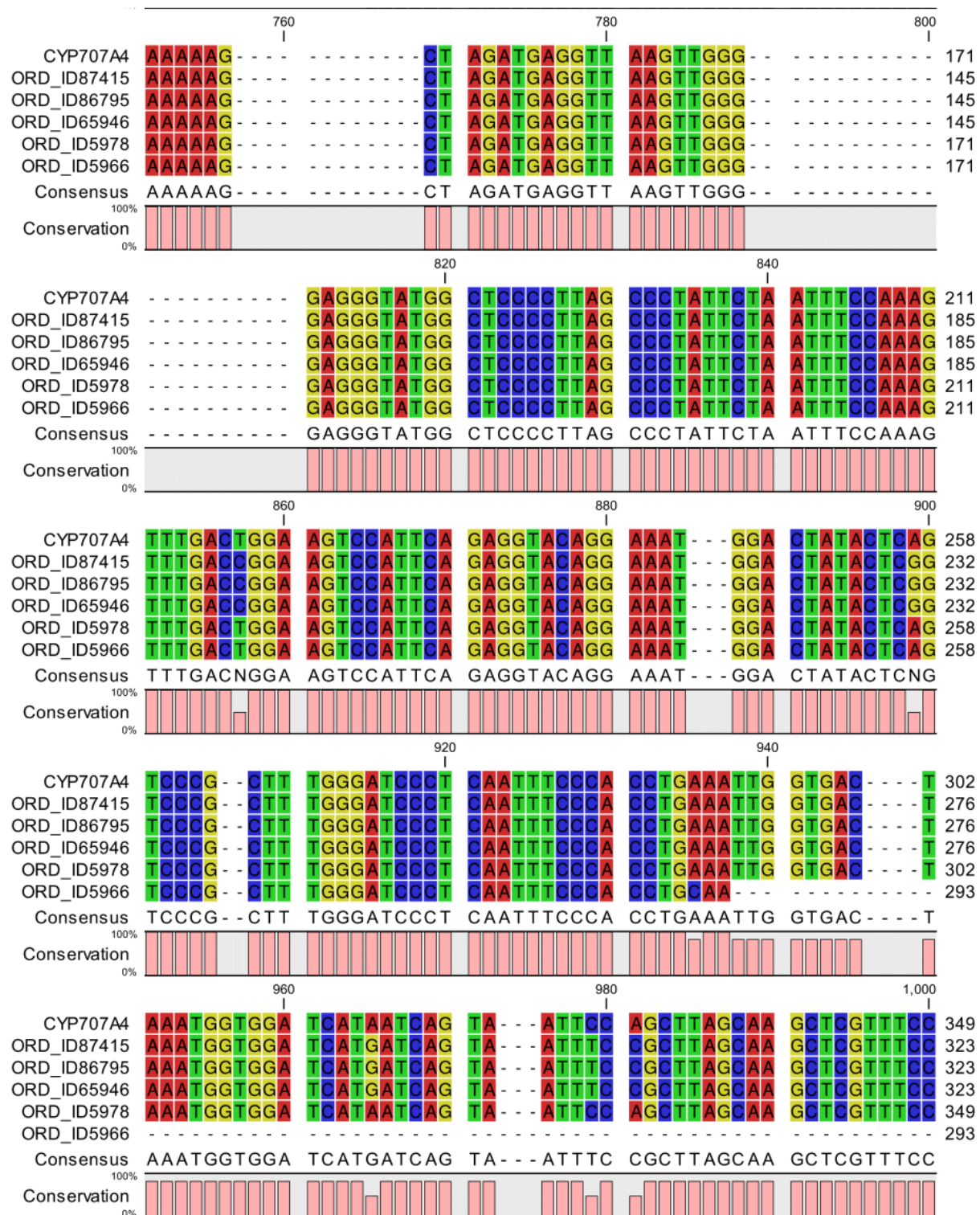


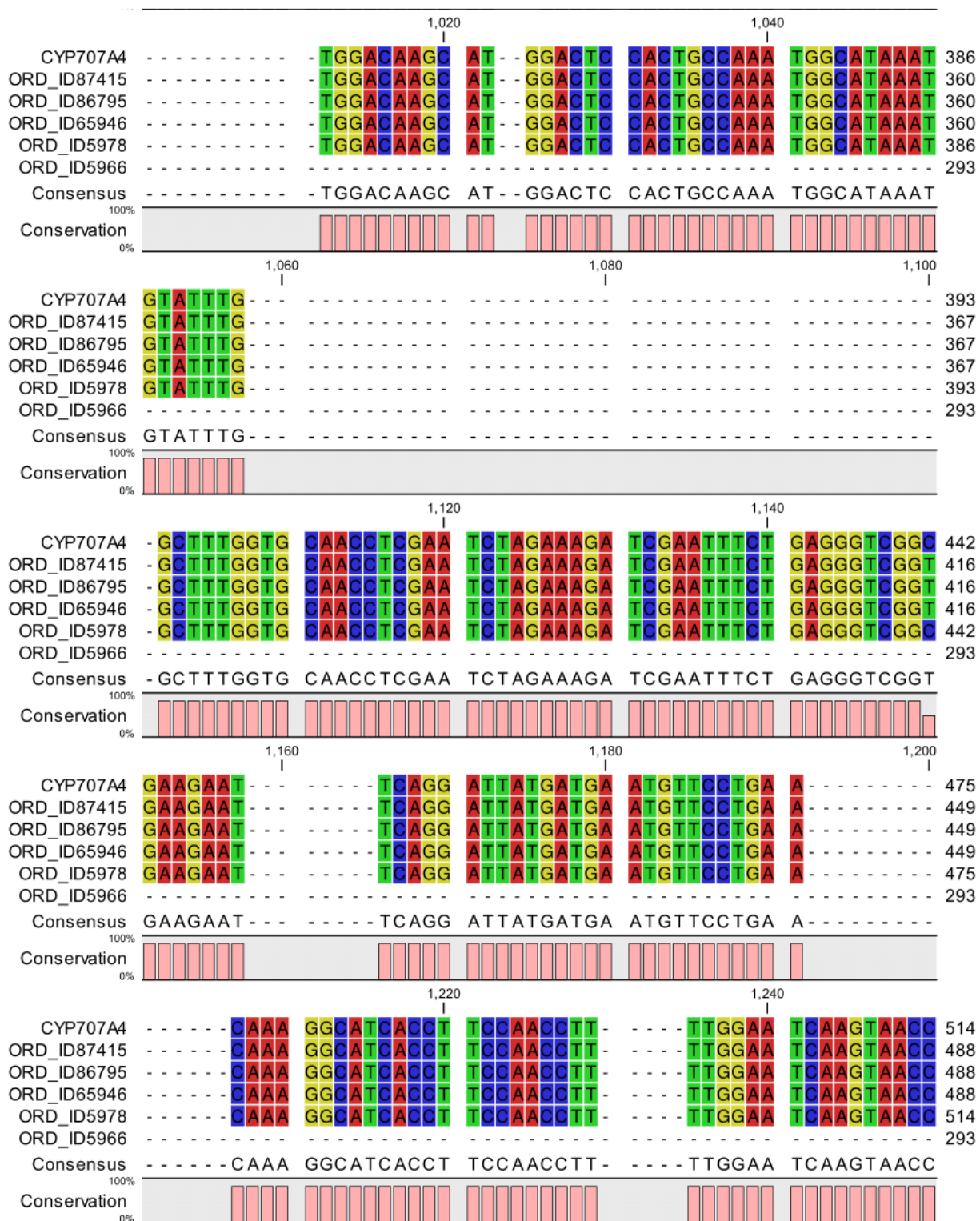
9.3.4 Alinhamento da sequência *CYP707A4* com as sequências homólogas no banco de dados genômico, base a base.

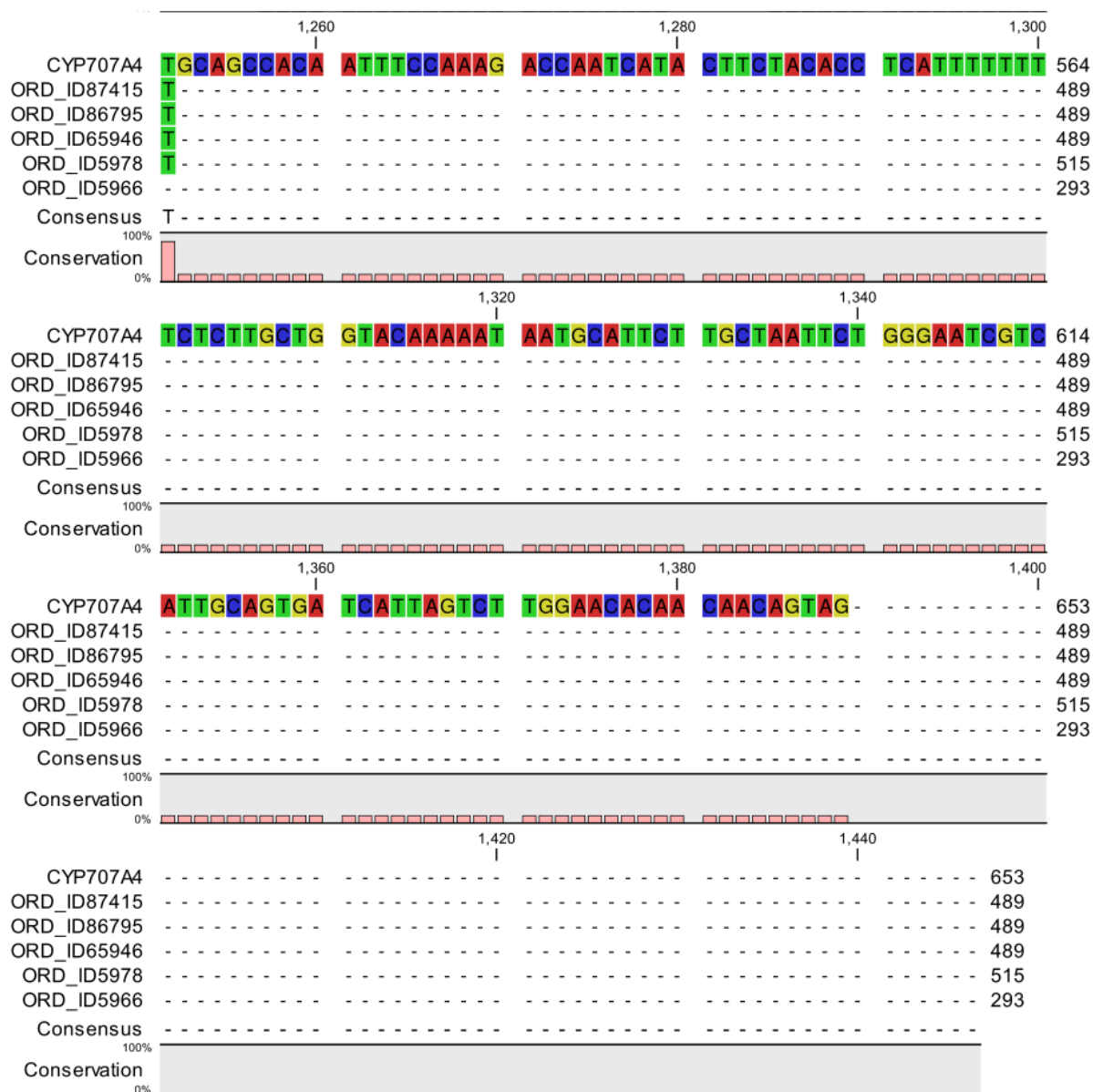








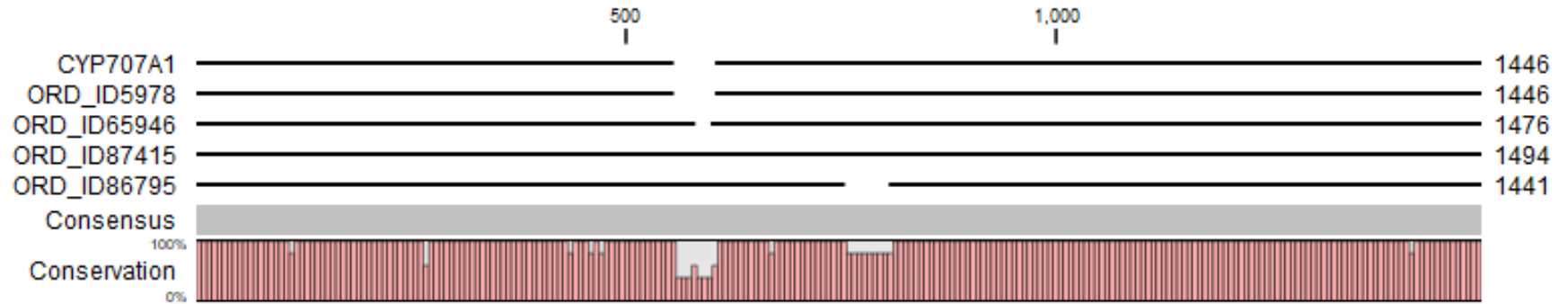




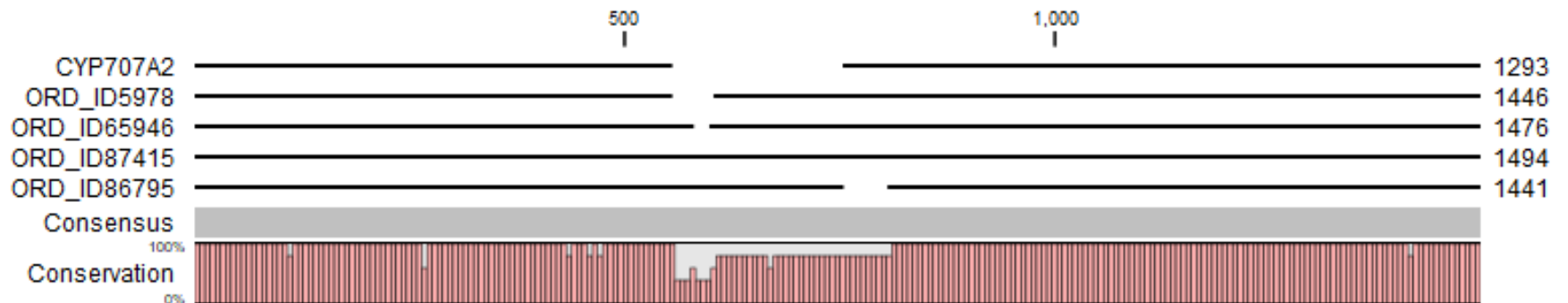
9.4 Alinhamento das CYP707A com banco de dados genômico (representação gráfica)

Representações gráficas dos alinhamentos das sequências com maior similaridade à cada CYP707A, presentes em transcriptoma de *Fragaria ananassa*.

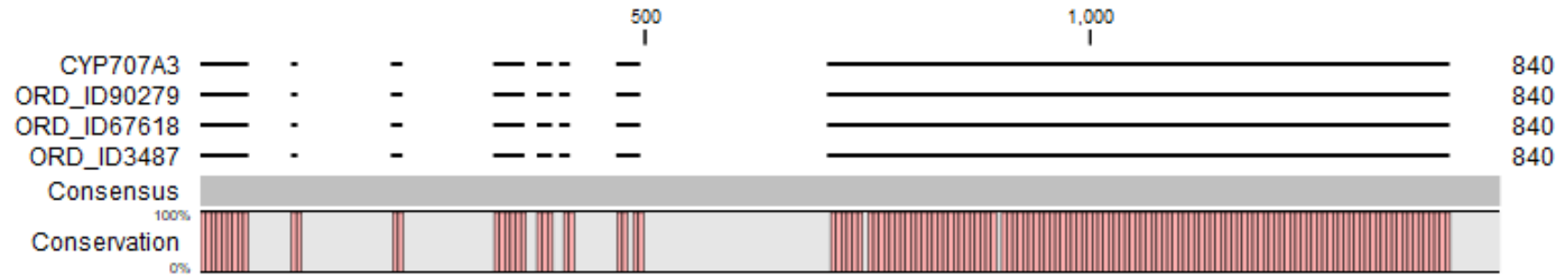
9.4.1 Alinhamento para CYP707A1



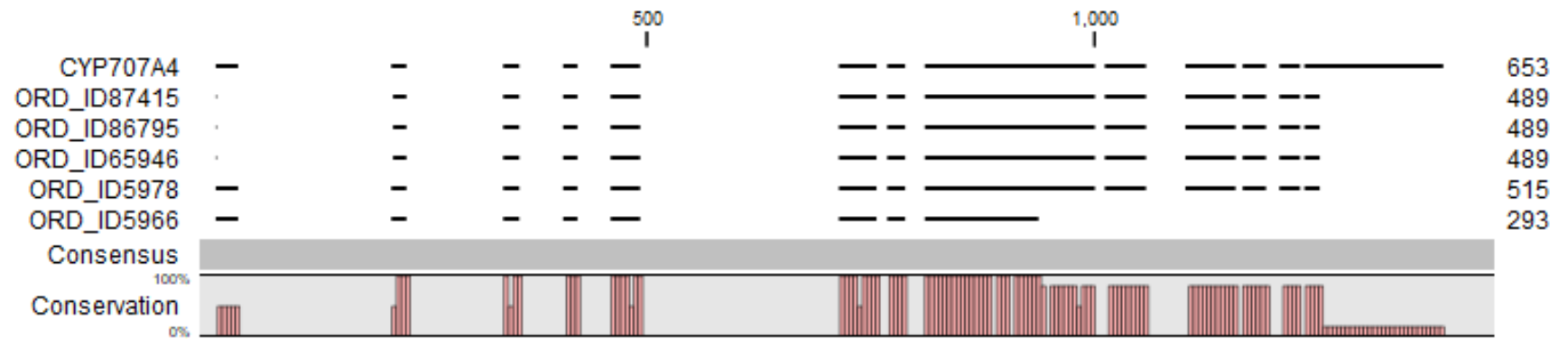
9.4.2 Alinhamento para CYP707A2



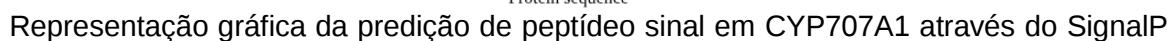
9.4.3 Alinhamento para CYP707A3



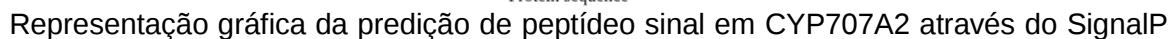
9.4.4 Alinhamento para CYP707A4



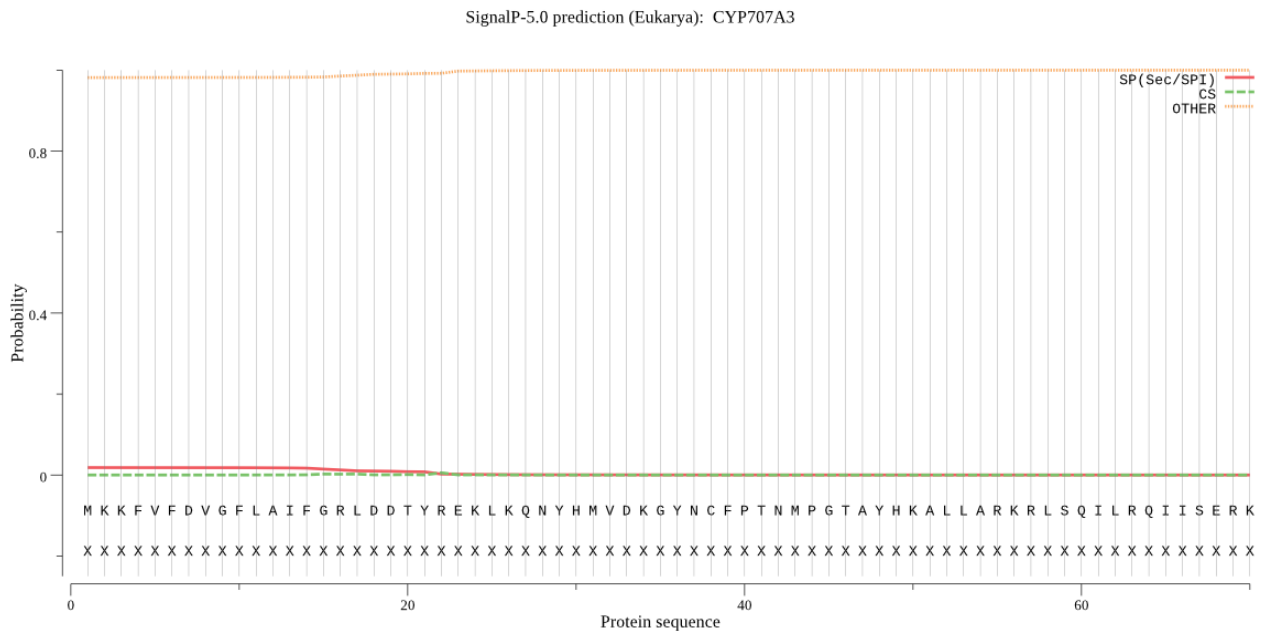
9.5.1 Peptídeo sinal



Fonte: SignalPHMM 5.0



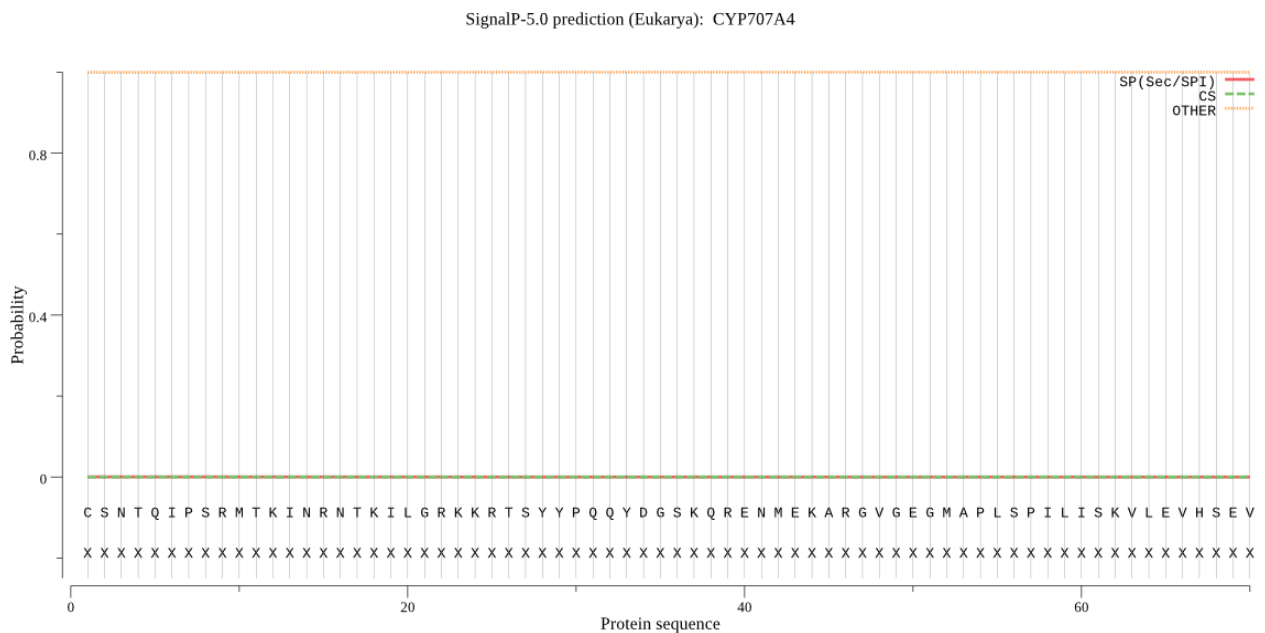
Fonte: SignalPHMM 5.0



Representação gráfica da predição de peptídeo sinal em CYP707A3 através do SignalP

5.0.

Fonte: SignalPHMM 5.0

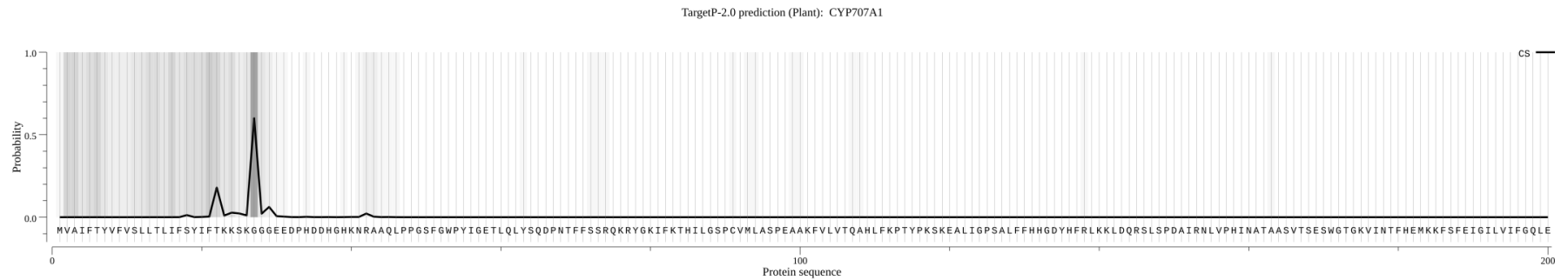


Representação gráfica da predição de peptídeo sinal em CYP707A4 através do SignalP

5.0.

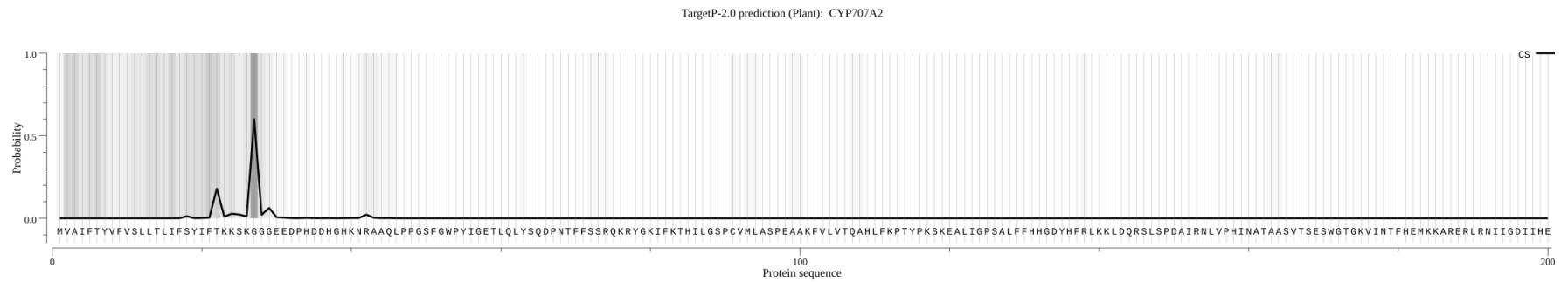
Fonte: SignalPHMM 5.0

9.5.2 Região transmembrana



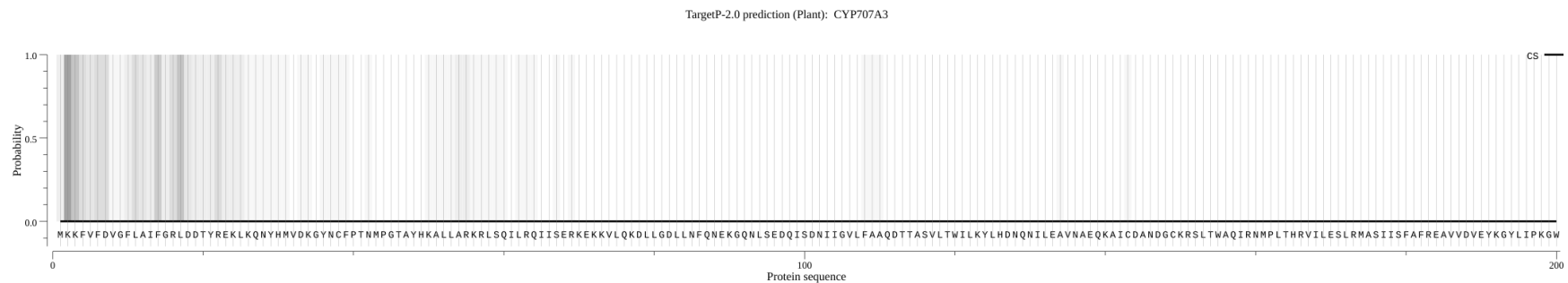
Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A1 através do TargetP 2.0.

Fonte: TargetP 2.0



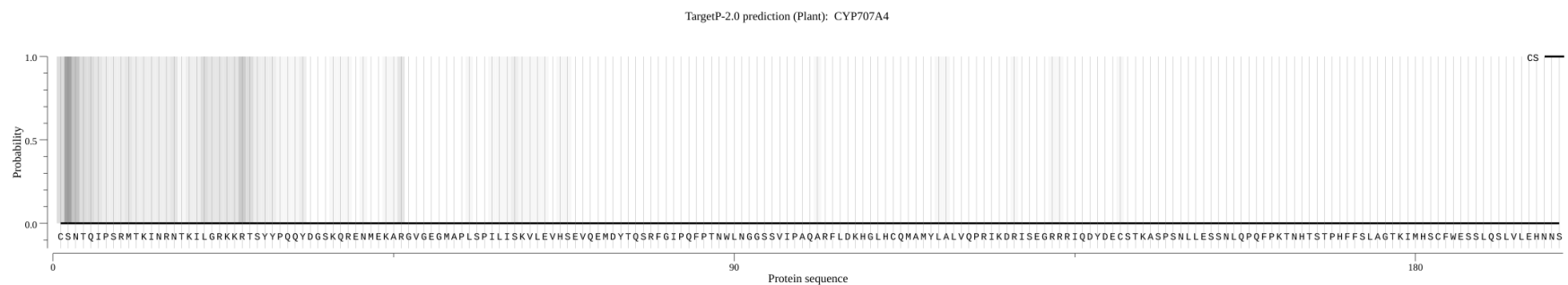
Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A2 através do TargetP 2.0.

Fonte: TargetP 2.0



Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A3 através do TargetP 2.0.

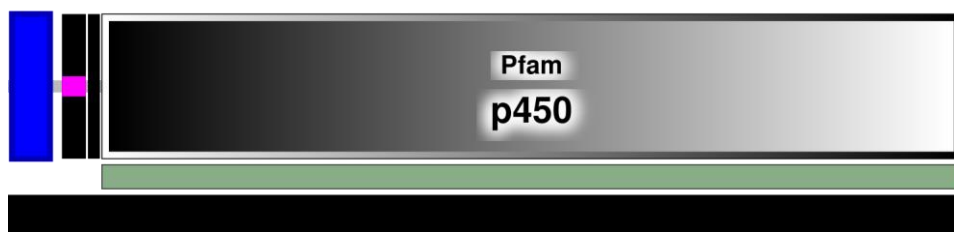
Fonte: TargetP 2.0



Representação gráfica da predição de região transmembrana em CYP707A4 através do TargetP 2.0.

Fonte: TargetP 2.0

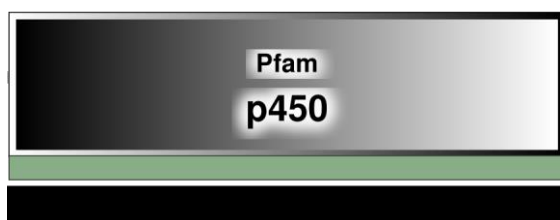
9.5.3 Domínios



Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A1 através do.
Fonte: HMMSmart.



Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A2, apresentando a sobreposição do domínio, apontando o possível erro de montagem.
Fonte: HMMSmart.

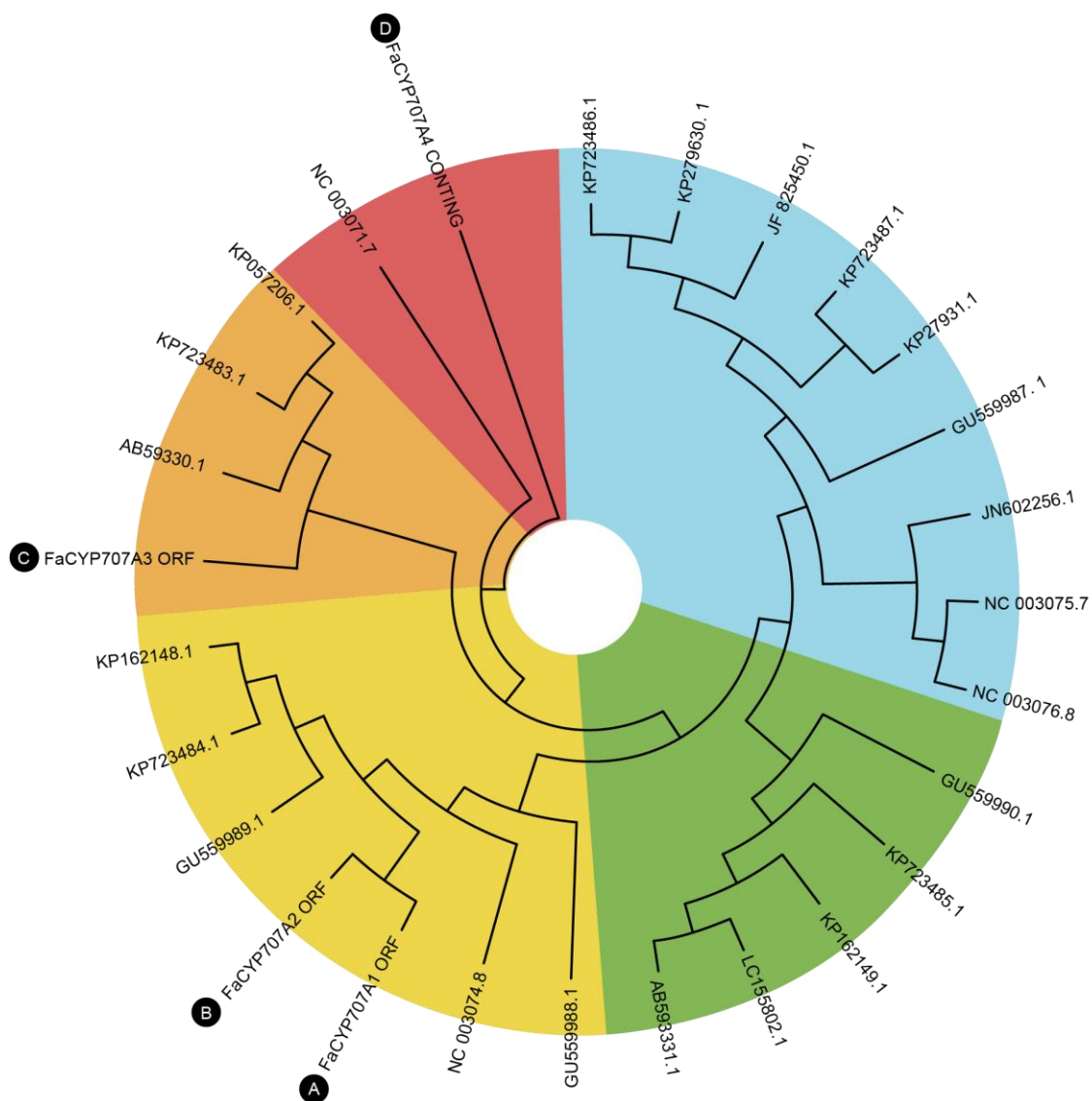


Representação gráfica da presença do superdomínio P450 em CYP707A3.
Fonte: HMMSmart.

9.6 Árvore filogenética

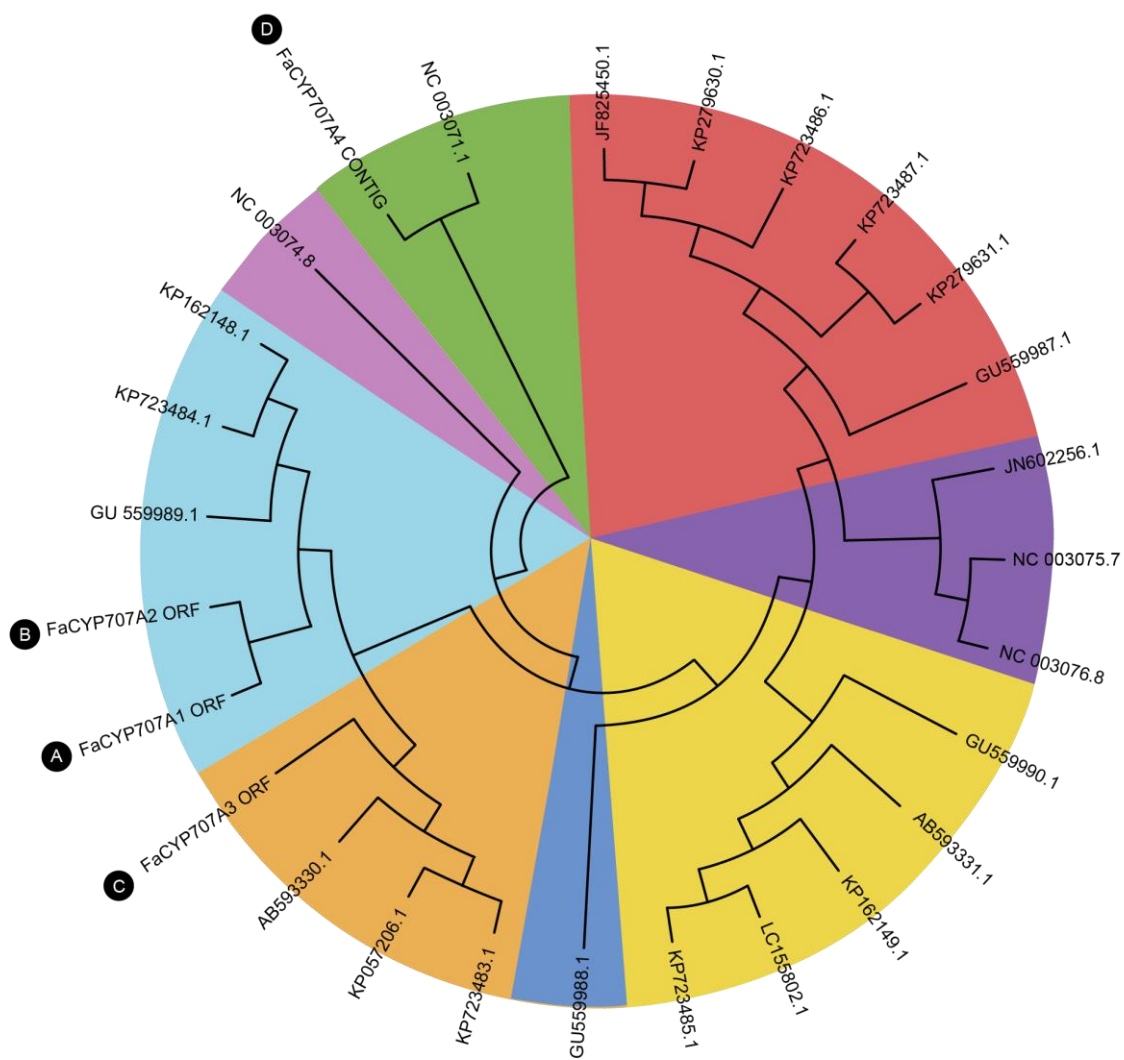
9.6.1 Alinhamento ClustalW – Método *Neighbor Joining*

Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*



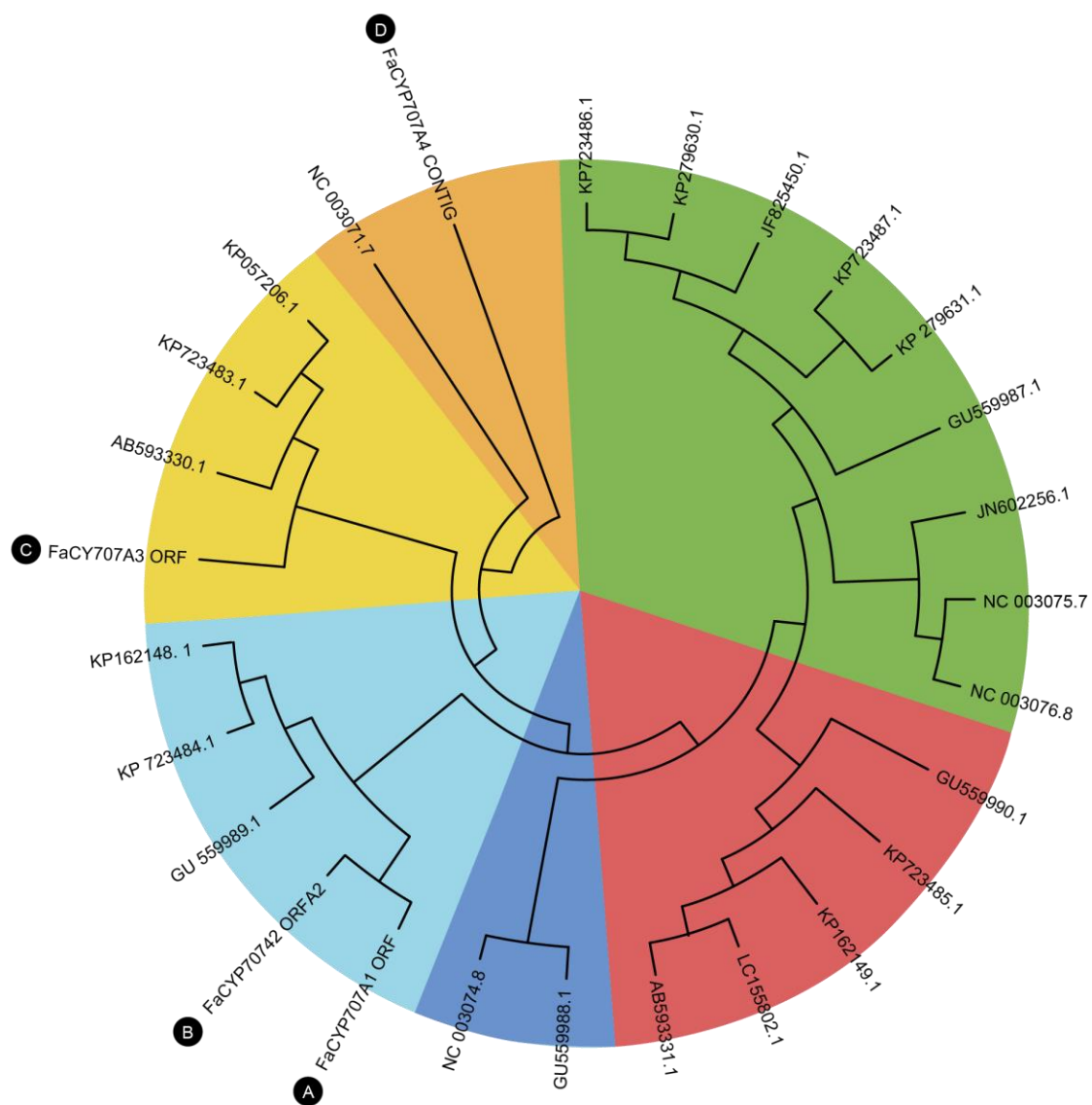
9.6.2 Alinhamento ClustalW – Método *Maximum Likelihood*

Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*



9.6.3 Alinhamento ClustalW – Método *Minimum Evolution*

Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*

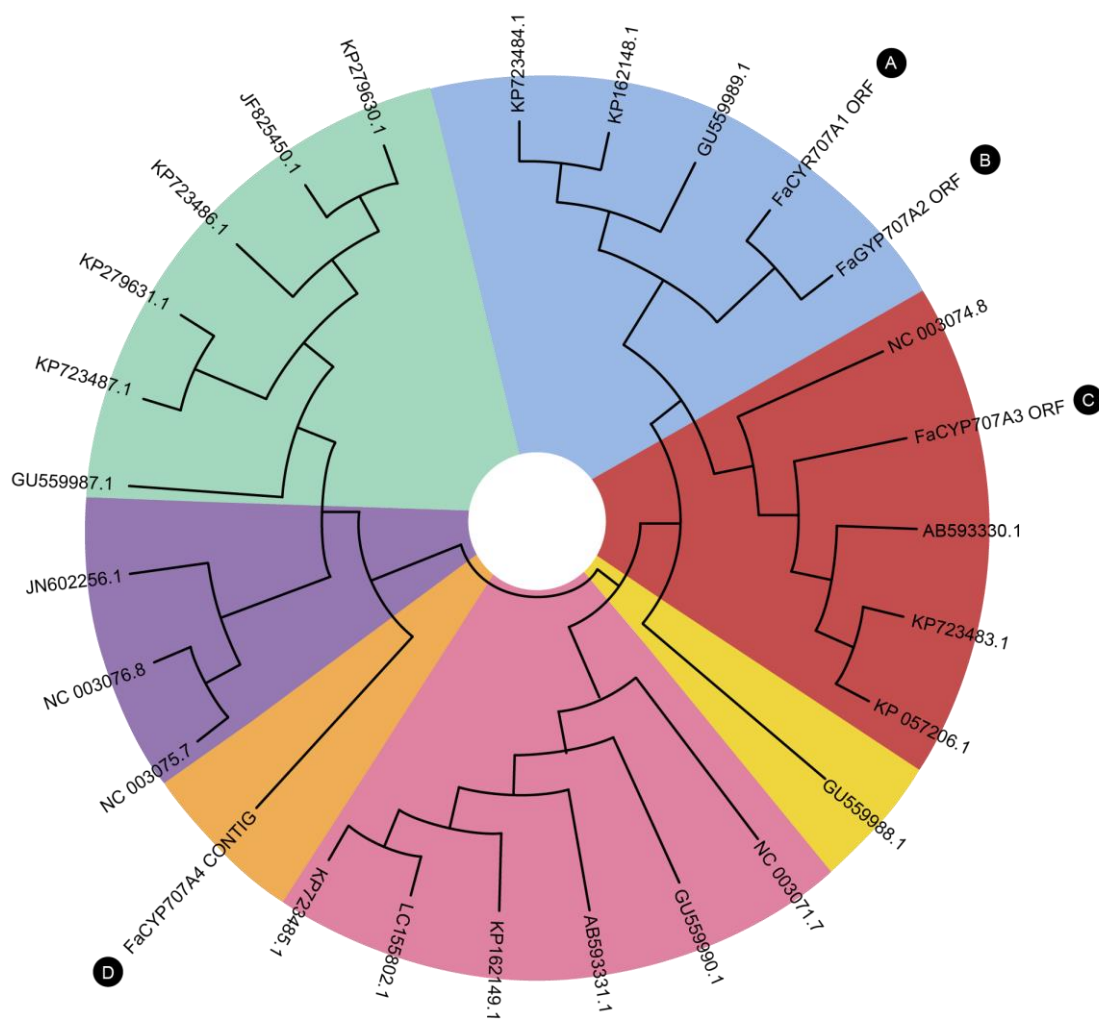


Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*



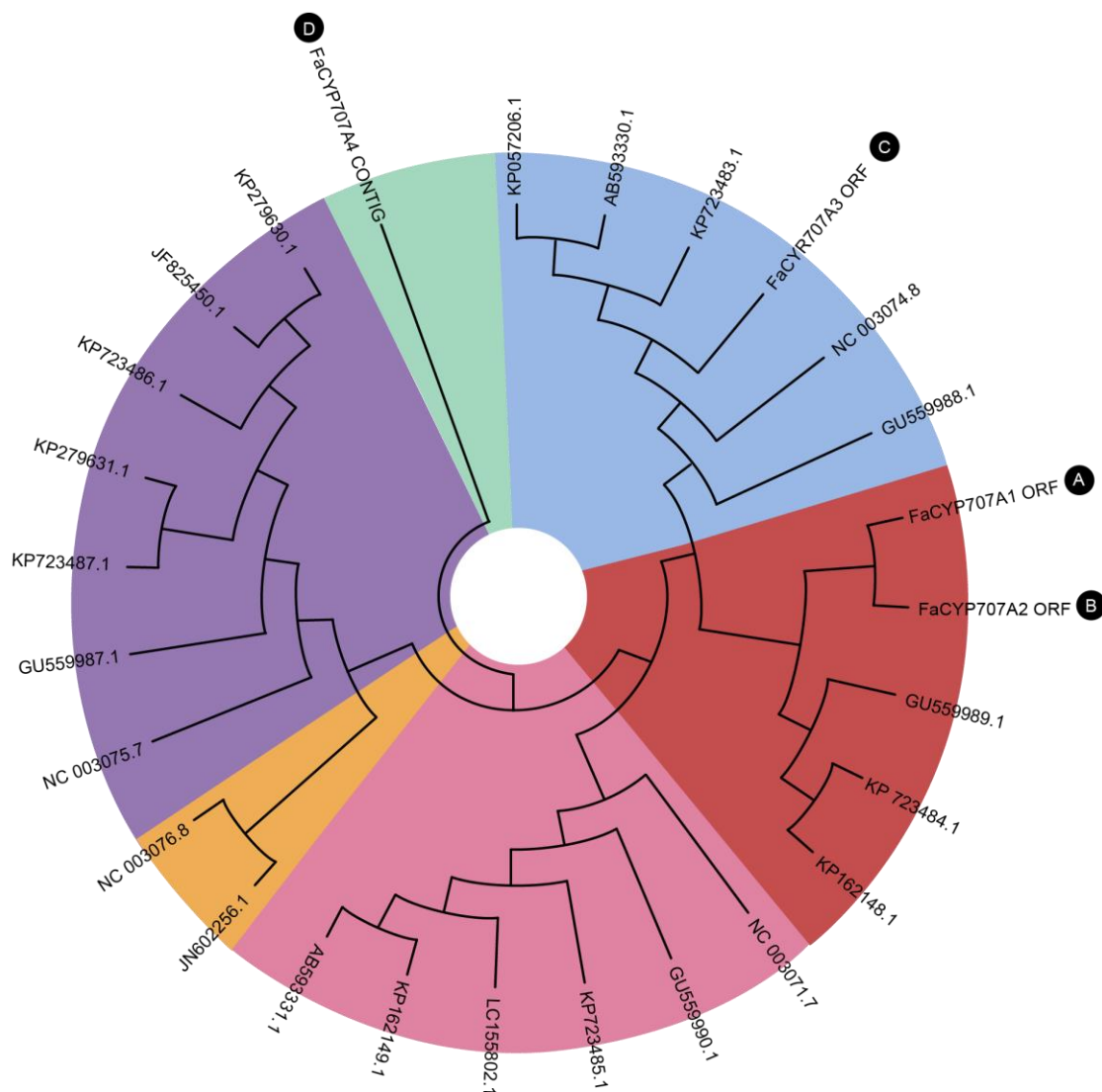
9.6.5 Alinhamento MUSCLE – Método *Maximum Likelihood*

Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*



9.6.6 Alinhamento MUSCLE – Método *Minimum Evolution*

Representações gráficas das árvores filogenéticas onde A representa a *CYP707A1*, B representa a *CYP707A2*, C representa a *CYP707A3* e D representa a *CYP707A4*



9.7 Vetor TRV2 com MCS

