

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



Trabalho de Conclusão de Curso

Genes *CYP707A* em *Fragaria* x *ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Pelotas, 2018

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



Trabalho de Conclusão de Curso

Genes *CYP707A* em *Fragaria* × *ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Pelotas, 2018

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Genes *CYP707A* em *Fragaria* x *ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico

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

Orientador Acadêmico: Profa. Dra. Vanessa Galli

Orientador do Estágio: Dra. Isabel Lopes Vighi

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G643g 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 / Hugo
Carlos Bolzon Gonzalez ; Vanessa Galli, orientadora. —
Pelotas, 2018.

49 f. : il.

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

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

CDD : 634.75

Hugo Carlos Bolzon Gonzalez

Genes *CYP707A* em *Fragaria* x *ananassa* Duch: identificação e caracterização funcional sob condições de estresse salino e aplicação de ácido abscísico

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

Data da Defesa: 23 de Fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi
Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Superieure Agronomique de Toulouse.

Dra. Fabiana Noora
Doutorado em Biotecnologia pela John Innes Centre-University of East Anglia.

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

Ma. Rosane Crizel
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a todos, em especial a minha família, por contribuíram para minha formação pessoal e intelectual, possibilitando que ao viver e observar o incomensurável mundo que nos cerca, seja capaz de buscar compreendê-lo um pouco.

Agradecimentos

Agradeço ao acaso, por tornar tudo possível.

Agradeço a minha mãe, por sempre lutar por mim e estar ao meu lado. Minha irmã e família por estarem presentes toda vida. Pelo carinho amor e cuidado.

Aos meus amigos de sempre e aos construídos durante esta jornada de vida, por toda lealdade, amizade e camaradagem em cada aventura vivida. Obrigado pelas experiências e por serem parte de tantos processos.

A minha companheira Larissa, por trazer esperança em tempos de confusão, como um lembrete de vida constante.

Ao curso de Biotecnologia, por ensinar, capacitar e estimular a natureza curiosa do ser, tão essencial para promover a pesquisa e a vontade de criar outras maneiras de vi(ver) nosso mundo.

Aos meus colegas de laboratório, por toda harmonia, amizade e pela capacidade desempenhada.

As minhas orientadoras Fabiana, Isabel e Rosane, por todos os ensinamentos, conversas e amparos. Sem mencionar a amizade incrível.

Ao professor Dr. Cesar Valmor Rombaldi, pelas orientações e por instigar o por que de convicções nos pensamentos diários.

A minha incrível orientadora, professora Dra. Vanessa Galli, por ter acreditado em mim e auxiliado em cada etapa deste processo de formação e transição.

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.

“We are all connected; To each other, biologically. To the earth, chemically. To the rest of the universe atomically.” – Neil deGrasse Tyson.

“Convictions are more dangerous enemies of truth than lies.” – Nietzsche.

Resumo

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.

O ácido abscísico (ABA) tem sido apontado como grande influenciador na resposta dos organismos vegetais aos cenários de estresse aos quais as culturas são constantemente submetidas. Dentre as rotas metabólicas do ABA, a síntese *de novo* e a inativação reversível por glicosilação são as mais conhecidas, enquanto a via de degradação promovida pela enzima Ácido Abscísico 8' – Hidroxilase 4, ainda é pouco elucidada, embora já se apresentem estudos apontando a via como alternativa na regulação do ABA. Esta enzima é codificada pelos genes *CYP707A*, sendo uma família multigênica. Morangos são culturas muito suscetíveis aos danos do estresse salino, sofrendo perdas consideráveis de produção derivado a fatores relacionados ao estresse. Apesar deste estresse ser regulado por ABA, apenas uma sequência gênica codificante para enzimas *CYP707A* estava descrita até o momento, dificultando o desenvolvimento de plantas mais tolerantes. Este trabalho objetivou identificar novas sequências codificadoras de genes *CYP707A* em morango e analisar o padrão de expressão destes genes em pseudofrutos de morangueiros submetidos ao estresse salino, com ou sem aplicação exógena de ABA. Para tanto, foi realizada pesca em transcriptoma utilizando como isca genes *CYP707A* descritos em outras espécies, obtendo-se três novas sequências até então desconhecidas pela literatura, as quais foram confirmadas pela presença de domínios característicos desta família gênica, utilizando ferramentas de bioinformática. A análise por RT-qPCR revelou alterações nos níveis de expressão dos genes encontrados sob os diferentes tratamentos de estresse salino e ABA, indicando relação entre os processos biológicos. Ainda, foi possível observar que alguns genes têm comportamento dissoante aos outros, indicando maior autonomia e versatilidade na ativação destes genes na resposta aos estressores.

Palavras-chave: morango; estresses abióticos; fitohormônios; 8'–hidroxilase.

Abstract

GONZALEZ, Hugo Carlos Bolzon. ***CYP707A* genes in *Fragaria* × *ananassa* Duch: identification and functional characterization under conditions of saline stress and application of abscisic acid.** 2018. 47s. Term paper (Bachelor of Biotechnology) - Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Abscisic acid (ABA) has been identified as a major influencer in the response of plant organisms to the stress scenarios to which crops are constantly submitted. Among the ABA metabolic pathways, de novo synthesis and glycosylation reversible inactivation are the best known, while the degradation pathway promoted by the enzyme Abscisic Acid 8'-Hydroxylase 4, is still poorly elucidated, although there are already studies showing this path as an alternative in ABA regulation. This enzyme is encoded by the *CYP707A* genes, being a multigenic family. Strawberries are crops that are very susceptible to saline stress damages, suffering considerable loss of production due to stress factors. Although this stress is regulated by ABA, only one gene sequence coding for *CYP707A* enzymes has been described so far, making it difficult to develop more tolerant plants. This work aimed to identify new sequences coding for *CYP707A* genes in strawberry and to analyze the expression pattern of these genes in strawberry pseudofruit submitted to saline stress, with or without exogenous application of ABA. For this, transcriptome search was performed using as bait *CYP707A* genes described in other species, obtaining three new sequences previously unknown in the literature, which were confirmed by the presence of characteristic domains of this gene family, using bioinformatics tools. The RT-qPCR analysis revealed alterations in the expression levels of the genes found under the different treatments of saline and ABA, indicating a relation between the biological processes. In addition, it was possible to observe that some genes have a disruptive behavior to the others, indicating greater autonomy and versatility in the activation of these genes in the response to the stressors.

Keywords: strawberry; abiotic stress; fitormonium; 8'-hydroxylase 4.

Lista de Figuras

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Esquema das rotas metabólicas de síntese, inativação e degradação do ácido abscísico..... | 28 |
| Figura 2 | Ilustração dos grupamentos das superfamílias p450 e CypX presentes na maior ORF da contig <i>CL15525Contig1</i> | 39 |
| Figura 3 | Gráficos relativos as expressões individuais dos genes <i>CYP17770</i> , <i>CYP18454</i> e <i>CYP24483</i> sob 4 diferentes tratamentos..... | 40 |
| Figura 4 | Gráficos comparativo das expressões dos genes <i>CYP17770</i> , <i>CYP18454</i> e <i>CYP24483</i> sob 4 diferentes tratamentos..... | 40 |

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Genes utilizados como iscas para busca de contigs de CYP707As de morango no transcriptoma 'in house'..... | 33 |
| Tabela 2 | <i>Primers</i> desenhados para realização de RT-qPCR sob os diferentes genes candidatos <i>CYP</i> identificados..... | 36 |
| Tabela 3 | Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores ORFs..... | 37 |
| Tabela 4 | Consulta ao SmartBlast utilizando a maior ORF de cada uma das contigs..... | 38 |

Sumário

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução..... | 13 |
| 2 | Objetivos..... | 14 |
| | Objetivos Específicos..... | 14 |
| 3 | Revisão Bibliográfica..... | 15 |
| 3.1 | Morango | 15 |
| 3.2 | Estresse salino em organismos vegetais..... | 16 |
| 3.3 | Efeitos do estresse salino sobre a germinação de sementes..... | 18 |
| 3.4 | Efeito do estresse salino sobre o potencial hídrico e a absorção de nutrientes..... | 18 |
| 3.5 | Efeito do estresse salino sobre a fotossíntese | 19 |
| 3.6 | Estresse salino e estresse oxidativo..... | 20 |
| 3.7 | Efeito do estresse salino sobre o crescimento e a produtividade vegetal..... | 21 |
| 3.8 | Mecanismos de tolerância ao estresse salino | 23 |
| 3.9 | Ácido abscísico e o estresse salino em plantas | 24 |
| 3.10 | Ácido abscísico 8'-hidroxilase em plantas | 29 |
| 3.11 | PCR em tempo real - (RT-qPCR) | 30 |
| 4 | Material e Métodos..... | 33 |
| 4.1 | Pesca em transcriptoma ' <i>in house</i> ' e identificação das <i>CONTIGS</i> | 33 |
| 4.2 | Identificação das <i>ORFs</i> | 34 |
| 4.3 | Caracterização | 34 |
| 4.4 | Cultivo e aplicação de estresse | 34 |
| 4.5 | Extração de RNA por método CTAB adaptado e síntese de cDNA..... | 35 |
| 4.6 | Desenho dos primers..... | 36 |
| 4.7 | RT-qPCR..... | 37 |
| 5 | Resultados e Discussão..... | 38 |
| 5.1 | Pesca em transcriptoma ' <i>in house</i> ' e identificação das <i>CONTIG</i> | 38 |
| 5.2 | Identificação das <i>ORFs</i> | 38 |
| 5.3 | Caracterização | 39 |
| 5.4 | Análise da expressão gênica por RT-qPCR | 40 |
| 6 | Conclusões..... | 42 |
| | Referências Bibliográficas | 43 |

1 Introdução

No decorrer do meu sétimo semestre do curso de Biotecnologia, ingressei como estagiário de Iniciação Científica em um grupo de pesquisa na área de Biotecnologia Vegetal, orientado pela professora Dra. Vanessa Galli, com coorientação do professor Dr. Cesar Valmor Rombaldi, ligado ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA. Dentre os projetos de pesquisa do grupo, fui bolsista de Iniciação Científica UFPel/AF do projeto ‘Aspectos bioquímico-moleculares e tecnológicos de atributos de qualidade nutricional, sensorial e funcional em frutas e hortaliças’, também estando inserido no projeto intitulado ‘Identificação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos processos de amadurecimento e de biofortificação de frutos de morango submetidos a estresses osmóticos’.

No segundo projeto, pude realizar o estágio final de conclusão de curso exigido pela grade curricular na obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob orientação da Dra. Isabel Lopes Vighi. Ali pude aprender e desenvolver técnicas de Biologia Molecular, associadas a Bioinformática, corroborando e ampliando o conhecimento adquirido em sala de aula, proporcionando formação e suporte para minha continuidade na vida acadêmica e científica, ainda, culminando na elaboração deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo identificar genes *CYP707A* em morango, na cultivar Camarosa, utilizando de bioinformática e de um transcriptoma ‘*in house*’ previamente obtido pelo grupo, seguida da extração de RNA de frutos de morango, submetidos a tratamentos para indução de estresse salino, com e sem aplicação exógena de ABA, para posterior análise de expressão gênica por PCR em tempo real, utilizando das diferentes *CYP707As* identificadas, de modo a avaliar suas relações/respostas aos tratamentos.

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar possíveis sequências de genes *CYP707A* em morango, além de realizar análise da expressão desses genes em frutos de morango submetidos à estresse salino, com ou sem aplicação exógena de ABA.

Objetivos Específicos

Identificar sequências de genes *CYP707A* em bancos de mRNA Seq obtidos a partir de frutos de morango;

Anotar e caracterizar as possíveis sequências de genes *CYP707A* identificadas;

Desenhar primers e avaliar o perfil de expressão dos genes *CYP707A* identificados, através de RT-qPCR, em amostras de morango submetidos à estresse salino, com ou sem aplicação exógena de ABA;

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Morango

O morango (*Fragaria* x *ananassa* Duch) é um pseudofruto de importância econômica devido a sua apreciação popular e elevado consumo, principalmente em função das suas características sensoriais, como: coloração, sabor e aroma (SCHAART et al., 2013). Em seu aroma, por exemplo, é possível identificar cerca de 350 compostos voláteis, atribuindo grande complexidade ao odor (VANDENDRIESSCHE et al., 2012). Além disso, é rico em vitamina C, complexo B, minerais e compostos bioativos, com destaque para os antioxidantes, os quais variam entre compostos fenólicos flavonoides (quercetina, kaempferol e miricetina), ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico e elágico), ácido hidroxicinâmico (p-cumarico), taninos hidrolisáveis (elagitaninos), catequina, epicatequina 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). Essas características tornam o morango atrativo ao consumidor, com produção no Brasil 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).

Pertencendo à família das Rosaceae, do gênero *Fragaria*, existem mais de 600 cultivares comerciais, as quais diferem entre si na sua composição bioquímica, fenotípica e características sensoriais, variando de acordo com cada genótipo, influenciadas pelo processo de cultivo (ANTUNES et al., 2010; PADULA et al., 2013; ERKAN et al., 2008).

Embora o cultivo do morango seja caracterizado pela elevada rentabilidade, ampliada pela diversidade de opções de beneficiamento e processamento dos pseudofrutos, além do emprego intensivo de mão de obra (MENDONÇA, 2011; ANDRIOLO et al., 2009), o mesmo apresenta alta sensibilidade aos déficits hídricos e nutricionais, uma vez que para o cultivo é necessário oferecer quantidades de água suficientes para o desenvolvimento das plantas que, por possuírem sistema radicular de pouca profundidade, área foliar extensa e frutos com elevado conteúdo de água, demandam quantidades consideráveis do recurso (KLAMKOWSKI e TREDER, 2006).

Como característica do cultivo comercial, são empregados fertilizantes como fonte de minerais solúveis e água de qualidade inadequada, acarretando em prejuízos ao solo,

desequilíbrio nutricional, resultando no acúmulo de sal no solo (JAMALIAN, GHOLAMI, & ESNA-ASHARI, 2013). Tais efeitos causam estresses ao cultivo, afetando a qualidade e produtividade das plantas uma vez que podem inibir o crescimento vegetal devido ao efeito osmótico e restringir a disponibilidade de água, trazendo prejuízo ao produtor. Em contrapartida, estudos mostram que a aplicação de estresses abióticos moderados pode caracterizar um meio de aumentar a concentração de compostos de interesse, o aporte nutricional, promovendo a biofortificação de culturas (PALMGREN et al., 2008).

Portanto, levando em consideração a alta sensibilidade da cultura ao estresse hídrico e salino, produzindo variações sensoriais dos pseudofrutos pelo processo de cultivo, justificado pelo valor econômico agregado e importância econômica, o morango apresenta-se como bom modelo biológico para estudo do estresse, para entendimento das relações de estresse e da produção de compostos de interesse, bem como é uma cultura que se beneficiaria diretamente da biofortificação por tratamentos de estresse abiótico e do desenvolvimento de plantas mais tolerantes a estes estresses.

3.2 Estresse salino em organismos vegetais

Estresses são definidos como qualquer fator abiótico (salinidade, calor, água, etc) ou biótico (herbívoros, patógenos) externo, que limita a taxa fotossintética e reduz a capacidade da planta em converter energia à biomassa. Estes estresses representam um problema central na agricultura, sendo responsáveis por perdas estimadas de 65 a 87% na produtividade (PARIHAR et al., 2014; ISMAIL et al., 2014; FAHAD et al., 2015). Um dos estresses que mais tem limitado o crescimento e a produtividade das culturas é o estresse salino (HUSSAIN et al., 2010). Este estresse é causado por altas concentrações de sais, comumente íons sódio e cloro, na fração solúvel do solo, afetando negativamente o potencial osmótico, uma vez que o aumento da concentrações de soluto dissolvidos numa quantidade de água, reduz a energia livre da água através da diluição, diminuindo o potencial osmótico da água, resultando em condições hipertônica e hiperosmótica, as quais afetam a habilidade das plantas em absorver água e micronutrientes (DEINLEIN et al., 2014). A salinidade tem sido uma ameaça à agricultura em algumas áreas do mundo há mais de 3000 anos, afetando mais de 6% do total de

terras cultivadas, o que corresponde a 800 milhões de hectares em todo o mundo (RENGASAMY, 2002; FAO, 2008).

Embora a percepção geral seja de que a salinização ocorre apenas em regiões áridas e semi-áridas, nenhuma zona climática está livre deste problema, especialmente considerando as previsões de mudanças climáticas para os próximos anos. A limitação de chuvas e a alta demanda por evapotranspiração, associados a solos pobres estão entre os principais fatores causadores desta salinidade (FAROOQ et al., 2015; PARIHAR et al., 2014). Além disso, este efeito tem se intensificado devido a práticas agrícolas como a irrigação, e a necessidade de avanço de áreas destinadas à agricultura para áreas marginais (DEINLEIN et al., 2014). Na região da planície costeira do Rio Grande do Sul, onde a água utilizada para irrigação provém da Laguna dos Patos, a salinização dos solos cultivados tem aumentado, uma vez que a laguna possui ligação com o oceano, sofrendo sua influência em períodos de menor precipitação.

Levando em consideração a crescente demanda por alimentos, alternativas que visem minimizar os efeitos ocasionados pelo estresse salino são de extrema importância. Devido sua natureza séssil, para controlar os impactos negativos da salinidade, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos adaptativos, sendo classificadas como halófitas as que apresentam eficiência na adaptação a solos salinos, e glicófitas, as que não são capazes de se desenvolver adequadamente nestes solos (PARIHAR et al., 2014). De modo geral, o estresse salino pode inibir o crescimento vegetal por duas razões. Primeiramente, a alta concentração de Na^+ e Cl^- no solo reduz a capacidade da planta em absorver água, levando a reduções nas taxas de crescimento devido à indisponibilidade deste solvente e ao desbalanço de nutrientes absorvidos, uma vez que esta condição favorece a absorção de alguns, em especial os íons Na^+ e Cl^- devido sua alta disponibilidade, em detrimento de outros. Isto refere-se ao efeito osmótico ou de déficit de água, ocasionado pelo estresse salino. Com o aumento do tempo de exposição, a quantidade excessiva de sal absorvida pelas raízes resulta no acúmulo de íons nos tecidos vegetais, podendo ocasionar toxicidade, afetando o crescimento vegetal por impedir processos metabólicos e reduzir a eficiência fotossintética, podendo inclusive ocasionar morte celular. Este é conhecido como o efeito iônico do estresse salino (FAROOQ et al., 2015).

Assim, o estresse salino reduz o potencial osmótico, perturba a homeostase iônica e resulta em toxicidade celular. Os efeitos deletérios são observados na planta como um todo, afetando os principais processos como germinação, relação osmótica, nutrição mineral, fotossíntese, estresse oxidativo, crescimento e produtividade (FAROOQ et al., 2015; DEINLEIN et al., 2014; PARIHAR et al., 2014).

3.3 Efeitos do estresse salino sobre a germinação de sementes

A germinação de sementes é a etapa mais crítica para o estabelecimento da muda, o que determina o sucesso da produção da cultura em solos afetados pela salinidade. Geralmente, o estresse salino durante a germinação atrasa este processo, reduz sua taxa e aumenta a dispersão dos eventos de germinação (FAROOQ et al., 2015; PARIHAR et al., 2014). Isto ocorre por reduzir o potencial osmótico da solução do solo, reduzindo a absorção de água pelas sementes; por causar toxicidade ao embrião; por alterar a síntese proteica; por causar distúrbios no balanço hormonal; e por reduzir a utilização das reservas da semente (PARIHAR et al., 2014). Apesar de a raiz ser o primeiro órgão exposto ao estresse salino, a parte aérea é a mais sensível. A salinidade reduz o crescimento da parte aérea por suprimir a iniciação e expansão foliar, o crescimento dos internodos e por acelerar a abscisão foliar. Além disso, a salinidade promove suberização da hipoderme e endoderme, e as estrias de Caspari se desenvolvem mais próximas à coifa, do que normalmente (QU et al. 2012). Outras consequências secundárias incluem o desbalanço de cálcio, afetando a integridade das membranas; a redução na acidificação do apoplasto, o que afeta negativamente a expansão da parede celular; e o aumento da atividade de enzimas associadas à quebra da parede celular (PARIHAR et al., 2014).

3.4 Efeito do estresse salino sobre o potencial hídrico e a absorção de nutrientes

O potencial hídrico é um parâmetro fisiológico importante para determinar o desenvolvimento vegetal, representa o potencial químico da água, ou seja, a energia livre associada as moléculas de água. O aumento na concentração de sais no solo pode levar a uma diminuição no potencial hídrico, interferindo na capacidade da planta de extrair

água do solo e manter turgor foliar e, por consequência, afetar muitos processos celulares dependentes de água nas plantas (PARIHAR et al., 2014).

Além disso, solos com baixo potencial hídrico alteram a capacidade de absorção de alguns minerais, causando distúrbios nutricionais nas plantas, afetando diretamente sua produtividade. A relação entre salinidade do solo e nutrição mineral das culturas é bastante complexa. Os distúrbios nutricionais podem ser ocasionados devido ao efeito da salinidade na disponibilidade de nutrientes, à competição entre minerais, ou a alterações no transporte ou distribuição destes dentro da planta (HUSSAIN et al., 2013). Em geral, íons Na_2^+ e Cl^- interferem na absorção de outros elementos minerais essenciais, como potássio, cálcio, nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco (QU et al., 2012). Por interferir na absorção de potássio, o excesso de Na_2^+ no solo resulta em perturbações na regulação estomática, que, em última instância, causa perda de água, agravando o déficit hídrico celular (ISMAIL et al., 2014).

Foi demonstrado que em cultivares de morango tratados com solução de NaCl houve aumento das concentrações de Na^+ em raízes, enquanto o conteúdo de Cl^- variou entre cultivares. Ainda foi observado que a concentração de Na^+ nas folhas em geral não sofreu alterações, embora algumas variedades apresentaram acúmulo de Cl^- foliar, indicando que o efeito do sal nas folhas seria proveniente do Cl^- e não do Na^+ (SAIED, 2003). KEUTGEN (2008) demonstrou que o Na^+ acumulou-se mais do que o Cl^- em frutos submetidos de morango ao tratamento salino. As concentrações de N, P, K, Ca, Mg, além de outros minerais, em ramos e raízes decresceram significativamente em morangueiros sob estresse salino (KARLIDAG, 2009).

3.5 Efeito do estresse salino sobre a fotossíntese

A fotossíntese é uma das rotas metabólicas de maior importância nas plantas, onde a energia solar é convertida à energia química e no crescimento vegetal. A redução nas taxas fotossintéticas em plantas submetidas a estresse salino ocorre devido à redução na disponibilidade de água nas células; à redução da condutância estomática, e portanto na absorção de gás carbônico; à atividade prejudicada de enzimas de fixação de carbono; à redução na concentração de pigmentos fotossintéticos, uma vez que altas concentrações de Cl^- levam à degradação da clorofila, resultando no surgimento de

manchas cloróticas nas folhas; e a destruição de aparelhos fotossintéticos, especialmente o fotossistema II (QU et al. 2012; FAROOQ et al., 2015; PARIHAR et al., 2014).

O estresse salino afeta a condutância estomática em dois momentos: imediatamente, devido a perturbações na relação de água; e pouco tempo depois devido à síntese local de ácido absísico. Além disso, a fotossíntese total diminui devido à inibição do desenvolvimento e expansão de folhas, bem como à abscisão foliar precoce. Conforme o estresse se prolonga, o acúmulo de altas concentrações de Na^+ e Cl^- no cloroplasto leva à inibição das reações metabólicas fotossintéticas, e a toxicidade iônica leva à ruptura de membranas e fechamento estomático completo, tornando estes os principais fatores responsáveis pela inibição da fotossíntese. Outros fatores que reduzem as taxas de fotossíntese sob o estresse salino incluem: desidratação das membranas celulares que reduzem sua permeabilidade ao dióxido de carbono, senescência aumentada, alterações na atividade enzimática induzidas por alterações na estrutura citoplasmática e feedback negativo por atividade reduzida dos órgãos dreno (PARIHAR et al., 2014).

Em morangueiros submetidos ao estresse salino, constatou-se que conforme a concentração de NaCl aumentava, a taxa de assimilação máxima foi afetada negativamente, seguido pela eficiência de carboxilação, podendo indicar que as reações da fase escura da fotossíntese podem ser mais prejudicadas do que as reação em claro, pela ação do sal (SAIED, 2003).

3.6 Estresse salino e estresse oxidativo

Além do impacto direto da salinidade em plantas, uma consequência comum da salinidade é o acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, danificar DNA e/ou interagir com outros componentes vitais da célula vegetal. Como o estresse salino pode levar ao fechamento estomático, a disponibilidade de dióxido de carbono nas folhas é reduzida e ocorre inibição na fixação de carbono, expondo cloroplastos à excessiva excitação de energia que, por sua vez, aumentam a geração de ROS, como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), e oxigênio

singleto (O₂). Além disso, o estresse salino leva a um déficit de água nas células, o que também leva à formação de ROS (AHMAD et al. 2012; PARIHAR et al., 2014).

Demonstrou-se que a produção de ROS durante os estresses ambientais, como a salinidade, é uma das principais causas de diminuição da produtividade das culturas (PARIHAR et al., 2014; ISMAIL et al., 2014). Portanto, o controle da concentração de ROS nas células é um processo crucial para evitar citotoxicidade indesejada e dano oxidativo. Por este motivo, em condições de estresse salino, as células vegetais induzem a produção de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbate redutase (MDHAR), dehidroascorbate redutase (DHAR), glutathiona-S-transferase (GST), dentre outras (SWAMI et al. 2011; ISMAIL et al. 2014). Além da ativação de enzimas responsáveis pela remoção de ROS, mecanismos não enzimáticos podem ser ativados, como um aumento no conteúdo de tocoferol ciclase, uma enzima crucial na biossíntese de α -tocoferol, de ácido ascórbico, de compostos fenólicos, dentre outros (YU et al., 2011).

Em morango tem sido relatado o aumento no conteúdo de compostos antioxidantes como compostos fenólicos e antocianinas quando submetidos a estresse salino, os quais estão acompanhados de aumento na expressão de genes relacionados à síntese destes compostos (GALLI et al., 2016.).

MUNEER (2014) observou que há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, bem como aumento na expressão dos genes codificadores das enzimas do sistema antioxidante como SOD, CAT, GR e APX, em cenários de baixo e moderado estresse gasoso (CO, NO_x e SO₂), relatando ainda que com o aumento do estresse aplicado, ocorre o efeito inverso e se inicia o decaimento da expressão destes genes. Embora a indução de enzimas antioxidantes seja tida como uma reação de proteção dos vegetais contra o estresse, o mecanismo de defesa como um todo ainda não está elucidado.

3.7 Efeito do estresse salino sobre o crescimento e a produtividade vegetal

Um dos efeitos iniciais do estresse salino é a redução da taxa de crescimento. O sal na água do solo inibe o crescimento das plantas por duas razões. Primeiro, reduz a capacidade da planta de absorver água e isso leva a um crescimento mais lento. Em

segundo lugar, a toxicidade iônica pode causar danos celulares nas folhas fotossintetizantes, reduzindo ainda mais o crescimento. Na medida em que a concentração de sal excede ao que pode ser compartimentalizado pela célula em vacúolos, este irá se acumular no citosol onde leva à inibição da atividade enzimática, ou irá se acumular na parede celular, onde causa desidratação da célula. A concentração excessiva de sal na célula por sua vez aumenta o potencial osmótico, restringindo ainda mais a absorção de água do solo (PARIHAR et al., 2014).

Os efeitos acima mencionados do estresse salino em plantas em última instância levam à redução do rendimento da cultura, sendo o efeito mais indesejável do estresse salino na agricultura. Este estresse também afeta a distribuição de carboidratos entre os órgãos destinados ao crescimento vegetativo e os associados à reprodução, o que resulta em menor produção de frutos e sementes (PARIHAR et al., 2014).

Os genes candidatos que controlam o crescimento provavelmente estão envolvidos nas vias de sinalização que começam com um sensor e envolvem hormônios, fatores de transcrição, proteínas quinases, proteínas fosfatases e outras moléculas de sinalização como proteínas de ligação à calmodulina. Muitos destes genes também estão associados à resposta a seca, visto que este estresse se assemelha ao estresse osmótico ocasionado pela salinidade. Muitos são induzidos por tratamento com ácido abscísico (ABA) (PARIHAR et al., 2014).

Em morango, vários estudos têm demonstrado os efeitos negativos do estresse, os quais variam de acordo com a variedade, e em que estágio de desenvolvimento o estresse foi aplicado. A aplicação de 80 mM de NaCl durante as fases iniciais de desenvolvimento da cultura resultaram em redução significativa na fitomassa de plantas de morango da cultivar Camarosa (GALLI et al., 2016). Ainda é possível observar redução da área total foliar, da taxa de expansão diária e do peso seco das folhas (SAIED, 2003). Relatou-se redução do peso fresco de morangos cultivados sob elevada salinidade, porém não foi constatado aumento do peso seco, indicando que o transporte de carboidratos aos pseudofrutos também foi reduzido pelo estresse (KEUTGEN, 2008). RIPOLL et al. 2014 mostrou que a maioria dos efeitos deletérios do estresse salino é observada quando o estresse ocorre durante os estádios iniciais de desenvolvimento da cultura do morango.

3.8 Mecanismos de tolerância ao estresse salino

A capacidade das plantas para sobreviver e produzir em condições de estresse salino é chamado de tolerância ao sal. Tolerância ao sal é um fenômeno complexo, e as plantas manifestam uma variedade de adaptações em níveis subcelulares, celulares e de órgãos. Alguns desses mecanismos incluem a restrição dos mecanismos envolvidos em absorção de sal, ajuste osmótico e manutenção do teor de água no tecido, controle de transporte de longa distância de sal, compartimentação de sal, extrusão de sal da planta, priorização da manutenção da razão K/Na^+ no citosol, regulação estomática, mudanças no equilíbrio hormonal, e ativação do sistema de defesa antioxidante (FAROOQ et al., 2015; JAFAR et al., 2012).

O ajuste osmótico ou a osmoregulação é a adaptação-chave de plantas no nível celular para minimizar os efeitos de estresse causado pela salinidade, especialmente durante a primeira fase deste estresse. Esta osmoregulação é realizada através da produção de solutos orgânicos e inorgânicos com o objetivo de reduzir o potencial da água sem diminuir o seu conteúdo. Açúcares solúveis, álcoois de açúcar, prolina, glicina e betaína, ácidos orgânicos e trealose estão entre os principais osmólitos (DEINLEIN et al, 2014). Na etapa de recuperação pós-estresse, a prolina também desempenha papel importante como molécula sinal na regulação da proliferação celular, morte celular e expressão de genes relacionados à recuperação do estresse (DEINLEIN et al, 2014). O acúmulo destes osmólitos é regulado pela superfamília de proteínas abundantes na embriogênese tardia (*late embryogenesis abundant (LEA) superfamily*) (PARIHAR et al., 2014).

A exclusão do excesso de sal ou sua compartimentalização no vacúolo através de antiporters H/Na , dirigido por gradiente de prótons, também são mecanismos adaptativos desenvolvidos pelas plantas. Desta forma, além de impedir o efeito tóxico em reações metabólicas do citosol, reduz o potencial osmótico, contribuindo para a osmoregulação (MUNNS E TESTER, 2008). Vários mutantes de sal de *Arabidopsis* excessivamente sensíveis (SOS), defeituosos na tolerância ao sal, foram caracterizados. Os mutantes SOS são especificamente hipersensíveis a altas concentrações de Na^+ ou Li^+ e também incapaz de crescer sob concentrações muito baixas de K^+ . Estes mutantes apresentam mutações em três alelos, SOS1, SOS2 e SOS3. O SOS1 codifica para uma proteína de

membrana plasmática Na⁺/H⁺ antiporter, responsável pela exclusão do sódio no apoplasto. O gene SOS2 codifica proteína quinase serina/treonina, que ativa o SOS1. E o gene SOS3 codifica uma proteína de ligação ao cálcio do tipo EF-hand com semelhanças com os sensores de cálcio neuronal animal e a subunidade B da calcineurina de levedura. Em levedura, a calcineurina desempenha um papel central na regulação do transporte de Na⁺ e K⁺ (DEINLEIN et al, 2014; PARIHAR et al., 2014; ISMAIL et al., 2014).

Em algumas plantas, a tolerância ao sal se deve à absorção do sódio em excesso no xilema pelas células do parênquima, com o objetivo de evitar seu transporte à parte aérea da planta (YEO et al. 1977). Outras ainda atuam na manutenção de potássio nas células e na capacidade de eliminar Na e Cl das folhas para manter uma alta razão K/Na nestas. Outro indicador de tolerância ao sal é a acidificação do apoplasto, que é necessário para permitir a extensibilidade da parede celular. Além disso, atividade aumentada de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos ajudam a manter o crescimento de plantas sob estresse salino por capturarem ROS, evitando danos oxidativos (WAKEEL et al, 2011).

Apesar destes mecanismos de tolerância, o estresse salino reduz a produtividade das culturas e tem levado a perdas contínuas de territórios aráveis. Estas perdas se tornam ainda mais importantes na situação atual, onde a agricultura precisa fornecer alimento suficiente a uma população mundial que está se expandindo rapidamente (estimativa de alcançar 9,6 bilhões em 2050) (DEINLEIN et al, 2014). Desta forma, desenvolver culturas agrícolas com maior tolerância a este estresse é uma alternativa promissora para solucionar estes desafios.

3.9 Ácido abscísico e o estresse salino em plantas

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são regidos pela síntese de hormônios com pequenas quantidades suficientes para regular o crescimento vegetal. Auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e o ácido abscísico são os fitohormônios mais importantes. Mudanças na abundância de várias enzimas envolvidas no metabolismo de fitohormônios como biossíntese de ácido jasmônico (JA) (óxido ciclase, AOC; lipoxigenase, LOX), biossíntese de giberelina (GA) (DWARF3), biossíntese de etileno

(SAMS), e biossíntese de ABA (9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase; NCED) foram detectados em plantas tratadas com sal (Deinlein et al, 2014; Parihar et al., 2014).

Em um ambiente salino, as raízes são as primeiras a detectar a disponibilidade de água prejudicada devido ao efeito osmótico, enviando um sinal ao restante da planta para ajustar seu metabolismo. Neste momento do estresse, o ABA, presente na extremidade das raízes, desempenha papel fundamental para sinalizar o restante da planta do estresse (ISMAIL et al., 2014). Ácido Abscísico (ABA) é um fitormônio descrito na década de 1960 como participante do processo de abertura de estômatos e murchamento em plantas. Desde seu descobrimento tem sido atribuído a ele a regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo maturação embrionária, dormência da semente, germinação, divisão e alongamento celular, indução floral e ao amadurecimento de frutos (SAH, 2016).

Ácido abscísico é considerado o fitorhormônio do estresse, uma vez que diferentes estresses tendem a induzir sua síntese. Este aumento na sua síntese tem como consequência uma série de respostas celulares, que por sua vez ativam uma cascata de transdução de sinal (ISMAIL et al., 2014; GOLLDACK et al., 2014). Compreender como o ABA regula os mecanismos de tolerância ao estresse em culturas agrícolas será de imensa ajuda para o desenvolvimento de culturas mais tolerantes.

No estresse salino, o aumento na concentração de ABA está associado a controle do status osmótico da planta. O mecanismo de atuação mais estudado é a regulação da abertura estomática, onde o ABA altera o transporte iônico nas células guarda, induzindo o fechamento estomático, com o objetivo de limitar a transpiração e a consequente perda de água. Esta abertura estomática ocorre devido à indução de concentrações aumentadas de Ca no citoplasma, induzido pelo ABA, resultando na abertura dos canais de K⁺, proporcionando a liberação do íon (BASU E RAMARA, 2017; VISHWAKARMA et al., 2017). Atualmente, se sabe que o ABA atua em uma série de outras respostas celulares no estresse. O ABA desencadeia reprogramação transcricional de mecanismos celulares de adaptação do estresse abiótico ao mesmo tempo que promove alterações transcricionais no metabolismo de carboidratos e lipídios, indicando a função do ABA na interface da resposta ao estresse da planta e do metabolismo primário celular (GOLLDACK et al., 2014).

Os sinais de ácido abscísico são percebidos por diferentes receptores celulares, havendo inclusive, percepção específica entre os compartimentos subcelulares. Este sinal percebido resulta então na ativação de cascatas de sinalização, culminando na ativação/inativação de genes responsivos a ABA, e na adaptação da célula ao estresse (BASU E RAMARA, 2017). Neste contexto, plantas submetidas a estresse salino mostraram aumento nos níveis transcricionais de NCED, bem como de fatores de transcrição ABA-dependente e de genes induzidos por fatores de transcrição dependentes de ABA, como, por exemplo, os genes LEA (GOLLACK et al., 2014).

Em conjunto com outros hormônios, o ABA regula o crescimento radicular, a expressão de genes responsivos à percepção do estresse (dehidrinas e proteínas LEA), bem como o acúmulo de osmoprotetores durante o estresse, em resposta à produção de ROS. A produção de enzimas antioxidantes para capturar o ROS produzido também é influenciada pelo acúmulo de H₂O₂ mediado por ABA, o qual causa a geração de NO que por sua vez ativa proteínas quinases mitógeno ativadas (MAPK), resultando na ativação de genes associados à síntese destas enzimas antioxidantes (SAKAMOTO et al., 2008; FAHAD et al., 2015).

Além disso, atua no mecanismo de restrição de Na e Cl nas folhas. Uma vez que a presença de ABA causa aumento no conteúdo de Na no vacúolo, impedindo seu transporte via xilema, e a aplicação exógena de ABA reduziu o acúmulo de Cl em folhas de citrus, além de aumentar a razão K/Na em arroz. O aumento no conteúdo de ABA durante o estresse salino também resulta na acidificação do apoplasto, o que se correlaciona com a expansão celular e, por consequência, no crescimento vegetal (BASU E RAMARA, 2017).

Em plantas superiores (angiospermas e gimnospermas) a rota de biossíntese do ABA é bem compreendida. Atualmente diversos mutantes foram identificados em variados pontos da rota em *Arabidopsis*, tomate e milho. (NORTH et al., 2007; HUO et al., 2013; BURBIDGE et al., 1999; NITSCH et al., 2009; TAN et al., 1997). A biossíntese do ABA possui como passo inicial a conversão, dentro do plastídeo vegetal, do carotenóide zeaxantina em trans-violaxantina através da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP/AtABA1). Estudos de superexpressão do gene ZEP mostram que as plantas

apresentam maior tolerância a estresses osmóticos, confirmando seu papel como fator determinante na resposta ao estresse (VISHWAKAWA et al., 2017).

Após esta etapa, o ácido 9-cis-violaxantina e/ou 9-cis-neoxantina sofre clivagem oxidativa catalisada pela enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenase (NCED), gerando como produto final o carotenoide xantoxina. A xantoxina produzida é então exportada ao citosol, onde é convertida em aldeído abscísico pela enzima ADR/AtABA2, sofrendo posterior oxidação a ABA pela ação da enzima aldeído-oxidase (AAO/AO) (SEILER et al., 2011). Experimentos de superexpressão em plantas transgênicas demonstraram que a enzima NCED é um passo chave na limitação da taxa de biossíntese do ABA (THOMPSON et al., 2000; IUCHI et al., 2001; TUNG et al., 2008), sendo que existe uma correlação positiva entre a expressão de NCED e o acúmulo de ABA (JONES, 2015).

Em morangos, até o momento foram identificados três genes da família NCED, tendo sido estudado quanto à influência no acúmulo de ABA durante a maturação apenas o gene FaNCED1 (JIA et al., 2011). Desta forma, faz-se ainda necessária a completa caracterização de todos os membros da família de genes FaNCEDs.

Além disso, em diversos estudos com outras culturas, a expressão dos genes NCED não foi relacionada diretamente com os respectivos níveis de ABA, o que sugere que o acúmulo de ABA pode ter uma regulação mais complexa, incluindo processos de homeostase entre a síntese e o catabolismo deste hormônio. De modo geral, o ABA ativo é rapidamente catabolizado em plantas superiores através de duas rotas principais, a inativação por glicosilação e a degradação oxidativa.

Na inativação por glicosilação, o ABA pode sofrer conjugação a ABA glicosil ester (ABA-GE), uma reação catalisada por UDP-glucosiltransferases citosólicas (GTs). Esta reação é reversível, sendo catalisada por β -glucosidases (BGs), através de transporte intracelular e intertesticial (entre tecidos), podendo afetar sua homeostase (HARTUNG et al., 2002; JIANG AND HARTUNG, 2008; SEO AND KOSHIBA, 2011; BURLA et al., 2013).

Estudos recentes mostram que o ABA-GE é acumulado em vacúolos, apoplastos e retículos, posteriormente é translocado para o retículo endoplasmático em resposta à desidratação celular (revisado por Jones, 2015). Duas β -glucosidases (BG1 e BG2) foram identificadas em *Arabidopsis* atuando na desidratação (XU et al., 2012, LEE et al., 2006).

A degradação oxidativa do ABA ocorre através da reação de hidroxilação. Por esta rota, dentre três diferentes grupos metil, o C-8' é a posição predominante para a hidroxilação, sendo mediada em Arabidopsis por proteínas codificadas pela família gênica da CYP707A (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004). O produto desta reação é o ácido faseico, o qual é convertido a ácido dehidrofaseico (DPA), sendo este último o principal metabólito derivado do ABA. (SETHA et al., 2005). Uma representação da integração das vias metabólicas pode ser observado na Figura 1.

As quatro enzimas AtCYP707A são induzidas transcricionalmente em condições de estresse hídrico. Esta enzima sofre regulação negativa quando da aplicação exógena de ABA (JONES, 2015).

Apesar do conhecimento da existência destas vias de degradação e inativação, o envolvimento de FaBGs e de FaCYP707As na resposta a estresse salino em frutos de morango ainda necessita ser elucidado.

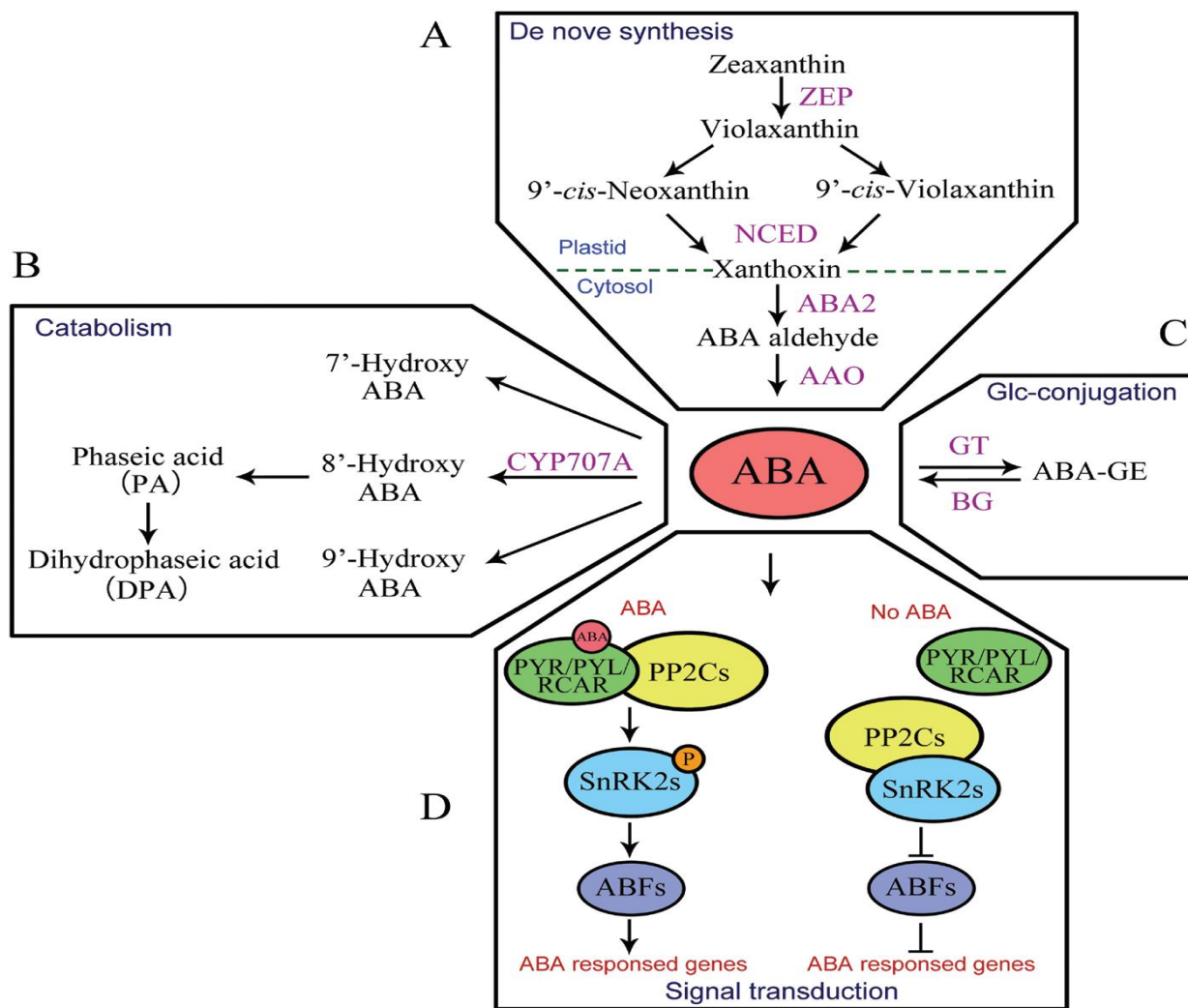


Figura 1. Esquema das rotas metabólicas de síntese, inativação e degradação do ácido abscísico. É possível observar a via de síntese pela enzima NCED, a glicosilação/inativação reversível pelo conjunto GT/BG, além da via catabólica promovida pela ação da *CYP707A*.

Fonte: Leng, P (2014).

3.10 Ácido abscísico 8'-hidroxilase em plantas

O ácido abscísico 8'-hidroxilase, uma monooxigenase da família P450 (NAMBARA et al 2010; FINKELSTEIN 2013), é a principal enzima responsável pelo catabolismo do ácido abscísico, transformando-o em ácido faseico, o qual é então convertido a ácido dehidrofaseico (DPA), sendo este último o principal metabólito derivado do ABA. São sintetizados a partir dos genes *CYP707A*, sendo este um gene pertencente a família CYP, com domínio p450 característico. Apresenta múltiplas cópias em diversas espécies,

sugerindo assim, que se trate de um grupamento gênico com mais de uma cópia em morangos.

A regulação da *CYP707A* já mostrou afetar o balanço dinâmico de ABA (SAITO et al., 2004). O aumento de expressão ou a perda de função do gene *CYP707A2* em *Arabidopsis*, afeta o nível de ABA em mudas, afetando a sensibilidade das mesmas à glicose exógena. 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).

Atualmente, sugere-se que os diferentes genes *CYP707A* apresentem funções específicas e papéis diferentes no metabolismo vegetal, com possível ação tecido-específica, bem como respondendo de diferentes formas aos estressores ambientais, com padrões de expressão diferenciados. Como exemplo, em *Arabidopsis* existem 4 genes mesmo da família *CYP707A* (*AtCYP707A1 - 4*), cada um com papel diferente em tecidos específicos e em diferentes estádios de desenvolvimento. *CYP707A2* possui papel significativo no processo de dormência de sementes, enquanto que *CYP707A3* não afeta este processo tendo ação conjunta com a *CYP707A1* no processo de maturação da semente (KUSHIRO et al., 2004; SAITO et al., 2004).

Embora seja conhecido o envolvimento os genes *CYP707A* nos processos de amadurecimento e tolerância ao estresse, com indução da produção de compostos de interesse em morango, pouco se tem descrito na literatura sobre sua estrutura, família e funcionalidade, tendo sido apenas um gene descrito até o momento em morango: *FaCYP707A1* (JI et al., 2012). Sendo assim, é necessário seu estudo e caracterização.

3.11 PCR em tempo real - (RT-qPCR)

Polymerase chain reaction: PCR, do inglês para 'reação em cadeia da polimerase' é uma técnica de biologia molecular que permite a síntese e amplificação de fragmentos de DNA específicos obtidos a partir de uma fita nucleotídica molde. Através desta metodologia é possível amplificar bilhares de vezes uma sequência de DNA de interesse diretamente de um genoma, plasmídeo ou outra fonte de material genético (NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004; ALBERTS et al., 2010). Com o desenvolvimento do monitoramento da PCR quantitativa em tempo real (qPCR: *quantitative real-time PCR*) permitiu um

enorme avanço no processo de quantificação de fragmentos de material genético (JAIN et al., 2006; ZHANG et al., 2009), suprimindo demanda da pesquisa e possibilitando novas análises, principalmente a quantificação da expressão gênica (WANG et al., 2009; MANOLI et al., 2012).

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

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

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

O SYBR® Green é um agente intercalante amplamente utilizado em qPCR como indicador de amplificação. Durante a etapa de polimerização da PCR promovida pela enzima Taq DNA polimerase as moléculas deste agente se ligam as duplas fitas de DNA recém-sintetizadas. O sistema óptico do termociclador excita as moléculas do SYBR®

Green com a emissão de um feixe luminoso que provoca a emissão de fluorescência verde com a ligação da molécula do agente com a fita dupla de DNA. A detecção da fluorescência ao final de cada etapa de extensão das fitas de DNA em cada ciclo da PCR, em tempo real, contínua e proporcionalmente, permite monitorar e estimar o total de DNA amplificado (GACHON et al., 2004; NOVAIS E PIRES-ALVES, 2004; ARYA et al., 2005). Na etapa seguinte do ciclo, ocorre a desnaturação do DNA, liberando as moléculas de SYBR® Green, promovendo queda na quantidade de fluorescência emitida.

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

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

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

4 Material e Métodos

4.1 Pesca em transcriptoma 'in house' e identificação das *CONTIGS*

Foram buscadas e selecionadas sequências de genes *CYP707A* indexadas ao banco de dados do *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) das espécies *Pyrus pyrifolia*, *Prunus avium*, e *Malus x domestica* (Tabela 1). Tais sequências foram utilizadas como referências no contraste ao banco de dados do transcriptoma 'in house' de *Fragaria ananassa*, cultivar *camarosa*, previamente obtido pelo grupo.

Após obtidas as sequências de referência, foi realizado contraste com o transcriptoma 'in house' através da ferramenta *MultiBlast*, do programa *CLC Genomics Workbench 10 – Quiagen®* a fim de identificar as sequências homólogas.

Tabela 1. Genes utilizados como iscas para busca de contigs de *CYP707A*s de morango no transcriptoma 'in house'

| 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 |

4.2 Identificação das ORFs

De modo a identificar as maiores sequências de DNA compreendidas entre um *codon* de início (ATG) da tradução e um *codon* de terminação, também chamados de fases de leitura abertas (do inglês *open reading frame* – ORF), submeteu-se as maiores *contigs* do transcriptoma que apresentaram melhor similaridade com os genes *CYP* de referência à ferramenta *ORFfinder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), utilizando-se como parâmetros de pesquisa os termos: Tamanho mínimo de ORF: 150 nucleotídeos; Código Genético: Universal; Códon Iniciador: Apenas ATG; Ignorar ORFs Sobrepostas: Não (de modo a prevenir que alguma possível ORF seja ignorada por estar sobreposta a outra). Tal metodologia visava identificar as possíveis fases de leitura aberta (tradução de *open reading frame* – ORF) para cada uma das *contigs*.

4.3 Caracterização

A maior fase de leitura aberta de cada *contig* identificada pelo *ORFfinder* foi utilizada como *query* nas ferramentas *SmartBlast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi>) e *BlastP* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no intuito de analisar a existência de superdomínios proteicos conservados, além de buscar identificar superdomínios de famílias proteicas em comparação com as sequências já indexadas nos bancos de dados do NCBI.

4.4 Cultivo e aplicação de estresse

O cultivo das plantas e a obtenção dos frutos deu-se através de cultivo em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado – Pelotas-RS, em vasos de 9 litros, com irrigação por gotejamento com ajuste diário do volume de água fornecido aos vasos conforme cálculo de evapotranspiração da cultura: $ET_c = 0,006K_c (25 + T_m)^2 (1 - U_{rm}/100)$, onde T_m é a temperatura média, U_{rm} a umidade relativa média e K_c o coeficiente da cultura foram controlados em cada fase de desenvolvimento. Os valores de umidade relativa e temperatura foram monitorados por *data loggers* instalados na casa de vegetação. Os valores de umidade e tensão mátrica foram monitorados semanalmente, utilizando um medidor de umidade (hidrofilômetro) e um potenciômetro,

respectivamente. A adubação de base foi constituída por uréia, superfosfato triplo e cloreto de potássio, como fontes de 267 kg ha⁻¹ N, 619 kg ha⁻¹ P₂O₅ ed 333 kg ha⁻¹ K₂O, respectivamente, de acordo com as recomendações para a cultura e análise prévia do solo (CQFS, 2004).

Foram trabalhados 4 grupos diferentes, com 3 plantas por repetição, sendo eles:

C - Controle;

ES - Estresse osmótico salino (ES) (80Mm de NaCl em 50ml, 3 vezes por semana depositado no solo);

ES+ABA - Estresse osmótico (ES) (80Mm de NaCl em 50ml, 3 vezes por semana depositado no solo) + aplicação exógena de 200µM de padrão comercial de ABA (Sigma) (Por pulverização, 1 vez por semana através de 25ml de solução a 200µM de ABA);

ABA - Aplicação exógena de 200µM de padrão comercial de ABA (Sigma) (Por pulverização, 1 vez por semana através de 25ml de solução a 200µM de ABA);

4.5 Extração de RNA por método CTAB adaptado e síntese de cDNA

Para extração de RNA foram utilizados frutos maduros (plenamente vermelhos, de acordo com JIA, et al. (2011)) colhidos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Amostras de frutos de morango compostos pelos seguintes 4 tratamentos, em 3 repetições para cada:

C - Controle;

ES - Estresse osmótico salino (ES) (80Mm de NaCl em 50ml, 3 vezes por semana depositado no solo);

ES+ABA - Estresse osmótico (ES) (80Mm de NaCl em 50ml, 3 vezes por semana depositado no solo) + aplicação exógena de 200µM de padrão comercial de ABA (Sigma) (Por pulverização, 1 vez por semana através de 25ml de solução a 200µM de ABA);

ABA - Aplicação exógena de 200µM de padrão comercial de ABA (Sigma) (Por pulverização, 1 vez por semana através de 25ml de solução a 200µM de ABA);

Alicotas de aproximadamente 100mg foram utilizadas para extração de RNA utilizando-se de protocolo CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) adaptado (MESSIAS et al., 2014).

Para síntese de cDNA, foi feita quantificação através do NanoVue®. O RNA total foi tratado com 1µL de DNase e 1µL de tampão de reação DNase I e posteriormente reversamente transcrito usando a enzima M-MLV e *primers* oligo-dT, todo o processo realizado conforme instruções do fabricante (Invitrogen™). A síntese de cDNA foi realizada de acordo com GALLI et al. (2015).

4.6 Desenho dos primers

Os primers para PCR em tempo real foram desenhados através do programa Vector NTI Advance 11 - Invitrogen® de modo que os *amplicons* não fossem superiores a 200 pares de base, tendo em vista que resultados satisfatórios em RT-qPCR são obtidos com fragmentos amplificados com entorno de 100, 150 pares de base. A temperatura de *melting* (T_m) foi mantida entre 58-62°C e o conteúdo de GC de 45-55%. As sequências desenhadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* desenhados para realização de RT-qPCR sob os diferentes genes *CYP* identificados.

| Nome | Sentido | Sequência | Genes | Amplicon |
|---------------------|---------|-----------------------------|--------------------|----------|
| CL17770_ CL15525 | F | CATGTTTCTGGTGTCTGCCC | CL17770 CL15525 | 159 |
| | R | GCACAAGACACCACAGCCAGT | | |
| CL18454 | F | ATGTCAATGATCTCTTACAC | CL18454 | 158 |
| | R | CATCATTGGAGTGCTGTTTG | | |
| CL24483 | F | AGACCAATCATACTTCTACACCTCAT | CL24483 | 121 |
| | R | CTACTGTTGTTGTGTTCCAAGACTAAT | | |
| CL28634 | F | CGCCAACAATAGACCACCTG | CL28634 | 173 |
| | R | TCCTGAGCCTGAGAAGTTTGAT | | |

4.7 RT-qPCR

Para realização do RT-qPCR, o cDNA foi diluído até concentração de 10 ng/mL^{-1} e amplificado por com volume final de reação em $20 \mu\text{L}$, onde: $1 \mu\text{L}$ do cDNA, $10 \mu\text{L}$ de Platinum SYBR green UDG (InvitrogenTM), e 3-5 pmol de cada *primer*, somado a água, fecharam a reação.

Para normalização dos dados da RT-qPCR, foram utilizados os genes de referência PIRUV_DESCARB (piruvato descarboxilase), e HISTH4 (histona H4) como descrito em GALLI et al. (2015). A expressão relativa então foi calculada de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ e estão apresentadas como expressões relativas. A análise foi amparada por três repetições biológicas para cada um dos 4 tratamentos, todas em duplicata analítica.

5 Resultados e Discussão

5.1 Pesca em transcriptoma 'in house' e identificação das *CONTIG*

Através do contraste das sequências análogas de outras espécies ao transcriptoma 'in house' da cultivar camarosa, foi possível identificar, no total, quatro prováveis sequências codificadoras de genes *CYP707A* em morango, sendo estas nomeadas: *CL15525Contig1*; *CL18454Contig1*; *CL17770Contig1* e *CL24483Contig1*. Das sequências identificadas a *CL15525Contig1* corresponde à sequência que já havia sido descrita na literatura até o momento por JIA et al. (2011), validando assim a identificação de três novas cópias gênicas de *CYP707A* em morango. Isto demonstra a capacidade de distinção e identificação de sequências de interesse desta metodologia, que quando refinada e aplicada a outras famílias gênicas, possa vir a auxiliar na identificação de novas sequências, diferentes das já descritas.

5.2 Identificação das *ORFs*

A pesquisa das sequências identificadas no *ORFfinder* permitiu obter informações relativas as *ORFs* de cada *contig*, sendo o enfoque na maior de cada sequência. Observou-se assim que a *contig* *CL15525Contig1* possuía maior *ORF* com 1446 nucleotídeos, enquanto *CL24483Contig1* apresentava a menor, com 291 nucleotídeos.

Foi possível ver que todas as *contigs* possuíam estrutura inversa, tendo suas maiores *ORFs* em sentido anti-senso, estando também todas fora de fase de leitura. (Tabela 3).

Tabela 3. Contigs do transcriptoma com suas respectivas maiores *ORFs*

| <i>CONTIG</i> | 'NT TOTAL' ¹ | <i>FRAME</i> | INÍCIO | FIM | NT <i>ORF</i> ² | AA <i>ORF</i> 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 |

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

5.3 Caracterização

Com a sequência aminoacídica prevista pelo *ORFfinder* para cada maior *ORF* de cada *contig*, foi possível verificar através do *SmartBlast* as referências já depositadas ao banco de dados de outras sequências similares em diferentes espécies, identificando aquelas que apresentam maior identidade e cobertura em relação à sequência consultada.

Os resultados mostram que *CL18454Contig1* apresentou maior identidade e cobertura com uma sequência de *CYP707A* de *Arabidopsis thaliana* enquanto que as outras *contigs* apresentaram maior similaridade às sequências de *Glycine max*.

Foi possível sugerir que as *contigs* *CL15525Contig1* e *CL17770Contig1* possam tratar-se de *CYP707A* completas, dado o comprimento similar que apresentam em relação aos acessos depositados no *Genbank* de outras espécies. Ainda, as descrições de identidade apresentadas para as quatro maiores *ORFs* das *contigs* avaliadas indicam que todas assemelham-se ao Ácido Abscísico 8'-Hidroxilase 4, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Consulta ao SmartBlast utilizando a maior ORF de cada uma das contigs.

| CONTIG | MATCH | DESCRIÇÃO | COBERTURA | IDENTIDADE | E-VALUE |
|----------------|-----------------------------|--|-----------|------------|---------|
| CL15525Contig1 | <i>Glycine max</i> | <i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4-like</i> | 99% | 71% | 0.0 |
| CL18454Contig1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4</i> | 100% | 73% | 1e-154 |
| CL17770Contig1 | <i>Glycine max</i> | <i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4</i> | 99% | 64% | 0.0 |
| CL24483Contig1 | <i>Glycine max</i> | <i>abscisic acid 8'-hydroxylase 4</i> | 97% | 80% | 1e-50 |

A mesma sequência aminoacídica prevista pelo *ORFfinder*, submetida ao *BlastP*, retornou como resposta um sumário gráfico que quando expandido, permitiu observar a presença da superfamília p450 em todas as quatro *CYP707A*, bem como uma homologia específica ao grupamento *CypX*, como ilustrado na Figura 2, referente ao *contig* *CL15525Contig1*.

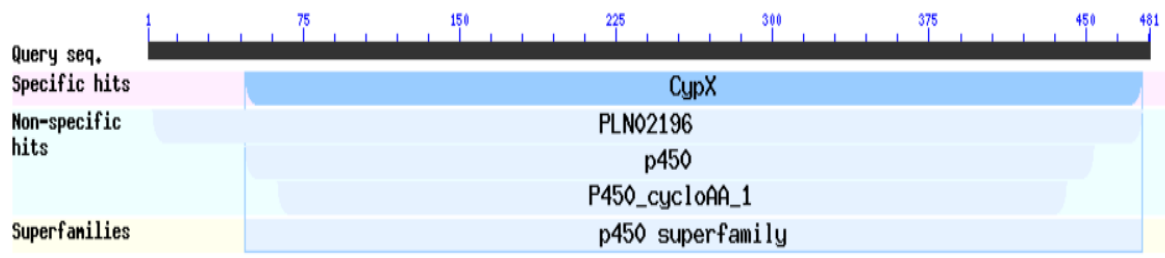


Figura 2. Ilustração dos grupamentos das superfamílias p450 e *CypX* presentes na maior ORF da contig *CL15525Contig1*

Fonte: BlastP - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

5.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Foi possível observar que a aplicação do estresse salino resultou em aumento da expressão dos genes *CYP18454* e *CYP28634*. Quando aplicado ABA nas plantas submetidas ao estresse, houve redução da expressão de todos os genes avaliados, com exceção da *CYP18454* que não sofreu alteração, em relação às plantas estressadas não submetidas à aplicação deste fitohormônio. As plantas suplementadas com ABA sem aplicação de estresse mostraram um aumento na expressão de *CYP18454* (Figura 3).

Como mostrado por Jones, 2015, os genes *CYP17770* e *CYP28634* apresentaram regulação negativa nos modelos tratados com ABA em situação de estresse. Por outro lado, a expressão destes genes não foi alterada em frutos submetidos à aplicação de ABA, sem a presença de estresse.

A *CYP18454* apresenta níveis de expressão inversos quando submetido aos tratamentos em relação aos outros genes *CYP* avaliados, sugerindo um papel diferente no processo de resposta ao estresse e ao metabolismo do ABA, do que o desempenhado pelos outros genes (Figura 4). Ainda, é possível supor que tal *CYP* possua maior sensibilidade às mudanças de ABA, embora possua um limite de resposta.

O gene *CYP24483* apresentou baixa expressão em frutos de morango, sugerindo que seu papel possa ter relação com outros tecidos e processos fisiológicos, não estando representada nos gráficos.

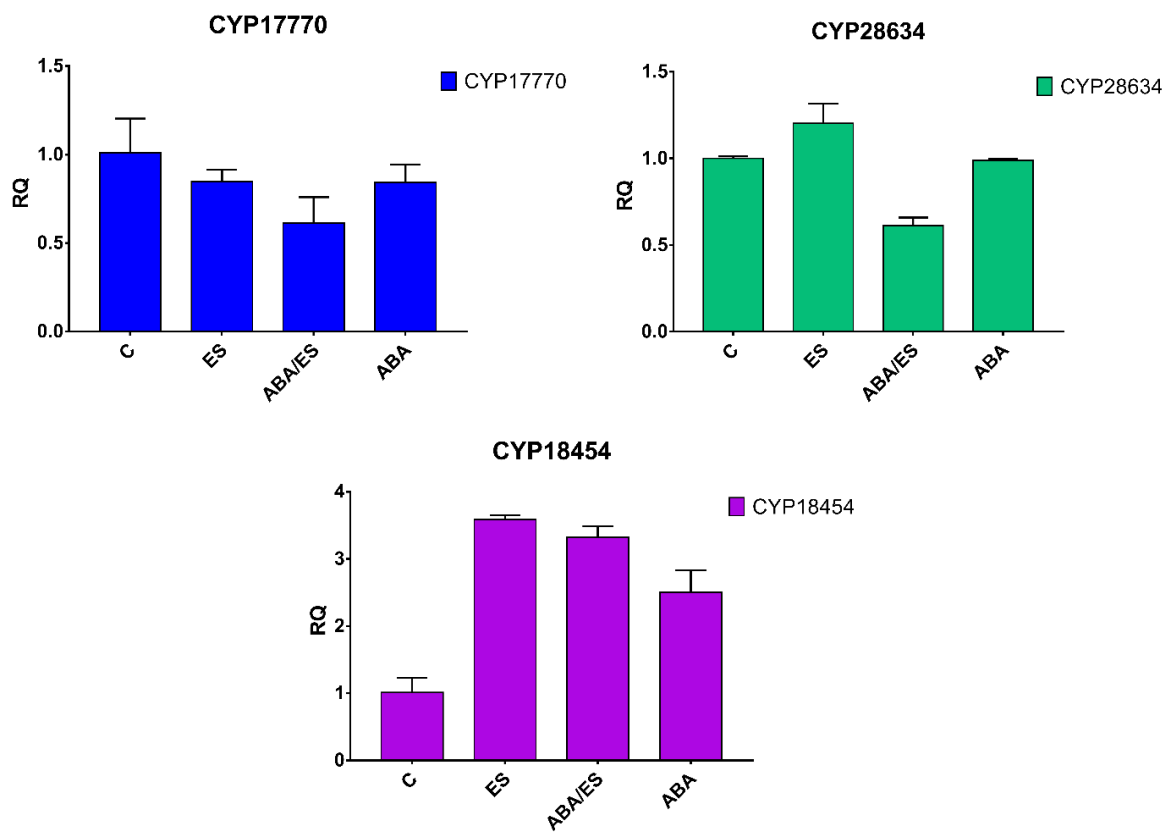


Figura 3. Gráficos relativos as expressões dos genes *CYP17770*, *CYP18454* e *CYP24483* sob 4 diferentes tratamentos.

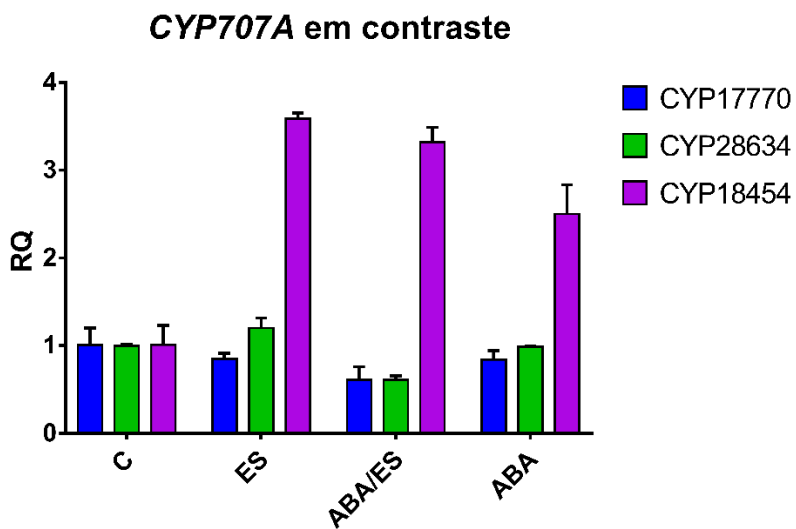


Figura 4. Gráficos comparativo das expressões dos genes *CYP17770*, *CYP18454* e *CYP24483* sob 4 diferentes tratamentos

6 Conclusões

Neste estudo foi possível identificar e caracterizar três novos genes *CYP707A* em morangos, ampliando o conhecimento prévio, aonde apenas uma sequência havia sido descrita. As análises de expressão gênica por PCR em tempo real permitiram constatar uma relação entre estresse salino, níveis de ABA e regulação da expressão dos genes *CYP707A*, onde diferentes genes *CYP707A* mostram respostas diferentes a estes estímulos.

Estes resultados contribuirão para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas com o objetivo de obter culturas mais resistentes ao estresse salino. Estudos promovendo superexpressão e silenciamento dos diferentes genes poderá auxiliar na descrição dos diferentes papéis por eles exercidos, além de permitir melhor compreensão da resposta promovida pelo estresse ao morango.

Referências Bibliográficas

- AHMAD, Parvaiz et al. Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2694, 2012.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.
- ANDRIOLO, Jerônimo Luiz et al. Cultivo sem solo do morangueiro com três métodos de fertirrigação. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 691-695, 2009
- ANTUNES, Luis Eduardo C. et al. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2010.
- ARYA, Manit et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- BASU, Supratim; RABARA, Roel. Abscisic acid—An enigma in the abiotic stress tolerance of crop plants. **Plant Gene**, v. 11, p. 90-98, 2017.
- 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 abscisic 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.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- DEINLEIN, Ulrich et al. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in plant science**, v. 19, n. 6, p. 371-379, 2014.
- ERKAN, Mustafa; WANG, Shioh 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.
- FAHAD, Shah et al. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 2, p. 391-404, 2015.
- 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.

- FARIDUDDIN, Qazi et al. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013.
- FAROOQ, Muhammad et al. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 461-481, 2015.
- GACHON, Claire; MINGAM, Annaïck; CHARRIER, Bénédicte. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.
- GALLI, Vanessa et al. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, v. 554, n. 2, p. 205-214, 2015.
- GIAMPIERI, Francesca et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9-19, 2012.
- 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.
- HARTUNG, Wolfram; SAUTER, Angela; HOSE, Eleonore. Abscisic 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.
- HUO, Heqiang et al. Expression of 9-cis-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE4 is essential for thermoinhibition of lettuce seed germination but not for seed development or stress tolerance. **The Plant Cell**, v. 25, n. 3, p. 884-900, 2013.
- HUSSAIN, Mubshar et al. Morphological and Physiological Basis of Salt Resistance in Different Rice Genotypes. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 1, 2013.
- 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.
- JAFAR, M. Z. et al. Improving the performance of wheat by seed priming under saline conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 198, n. 1, p. 38-45, 2012.
- JAIN, Mukesh et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.

- JAMALIAN, Salma; GHOLAMI, Mansour; ESNA-ASHARI, Mahmood. Abscisic acid-mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield in strawberry under different salt stress regimes. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 4, p. 291-299, 2013.
- 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.
- 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.
- KARLIDAG, Huseyin; YILDIRIM, Ertan; TURAN, Metin. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 2, p. 180-187, 2009.
- KEUTGEN, Anna J.; PAWELZIK, Elke. Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1413-1420, 2008.
- KLAMKOWSKI, Krzysztof; TREDER, Waldemar. Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 71, n. 4, p. 159-165, 2007.
- 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.
- 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.
- MANOLI, Alessandro et al. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 8, p. 807-815, 2012.
- MENDONÇA, HELOÍSA FERRO CONSTÂNCIO. **PRODUÇÃO E QUALIDADE DE MORANGOS EM CULTIVO PROTEGIDO CONSORCIADO COM A FIGUEIRA**. 2011. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO.
- MESSIAS, Rafael da Silva et al. Isolation of high-quality rna from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697-707, 2014.
- MUNEER, Sowbiya et al. Effect of CO, NOx and SO2 on ROS Production, Photosynthesis and Ascorbate–glutathione Pathway to Induce *Fragaria annasa* as a Hyperaccumulator. **Redox biology**, v. 2, p. 91-98, 2014.

MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NITSCH, Lisette Maria Catharina et al. Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by LeNCED1 and SICYP707A1. **Planta**, v. 229, n. 6, p. 1335-1346, 2009.

NORTH, Helen M. et al. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. **The Plant Journal**, v. 50, n. 5, p. 810-824, 2007.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, jul./dez. 2004.

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.

PALMGREN, Michael G. et al. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends in plant science**, v. 13, n. 9, p. 464-473, 2008.

PARIHAR, Parul et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2015.

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.

QU, Chunxiang et al. Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. **Environmental and experimental botany**, v. 75, p. 134-141, 2012.

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.

RENGASAMY, P. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 42, n. 3, p. 351-361, 2002.

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

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

SAIED, A. S.; KEUTGEN, N.; NOGA, G. EFFECTS OF NaCl STRESS ON LEAF GROWTH, PHOTOSYNTHESIS AND IONIC CONTENTS OF STRAWBERRY CV'S 'ELSANTA' AND 'KORONA'. In: **International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment 609**. 2003. p. 67-73.

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

SAKAMOTO, Hikaru; MATSUDA, Osamu; IBA, Koh. ITN1, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, v. 56, n. 3, p. 411-422, 2008.

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.

SWAMI, Ajit Kumar et al. Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 321-328, 2011.

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.

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.

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.

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.

VISHWAKARMA, Kanchan et al. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 161, 2017.

WAKEEL, Abdul et al. Potassium substitution by sodium in plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 30, n. 4, p. 401-413, 2011.

WANG, Lei et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. **The Plant Journal**, v. 61, n. 5, p. 752-766, 2010.

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.

YEO, A. R. et al. Ion distribution in salt-stressed mature Zea mays roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. **Journal of Experimental Botany**, v. 28, n. 1, p. 17-29, 1977.

YU, Juanjuan et al. Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 9, p. 3852-3870, 2011.

ZHANG, JiaLiang et al. Expression pattern of GS3 during panicle development in rice under drought stress: quantification normalized against selected housekeeping genes in Real-Time PCR. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 4, p. 285-292, 2009.

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.