

WRKYS EM *Fragaria x ananassa*: IDENTIFICAÇÃO E PREDIÇÃO DE ELEMENTOS CIS

AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO¹; ROSANE LOPES CRIZEL²; MARIANA PINTO DA MOTA GOMES³; CHRISTIAN SANCHEZ⁴; VANESSA GALLI⁵

¹ Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPEL) – audreycn97@gmail.com

² Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas – DCTA (UFPEL) – rosanecrizel1@hotmail.com

³ Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPEL) – gomesmmariana13@gmail.com

⁴ Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPEL) – christian.kun@gmail.com

⁵ Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPEL) – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é pseudofruto muito consumido e apreciado devido suas propriedades organolépticas e funcionais. No entanto, a produção de morango é limitada por uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos que causam perdas significativas no rendimento a cada ano, bem como uma diminuição da qualidade do fruto (Nezhadahmadi et al., 2015; Kirnak et al., 2001). Para se adaptar aos estresses bióticos e abióticos recorrentes, as células vegetais regulam a expressão de diversos genes relacionados com o processo adaptativo (Jang et al., 2010).

Dentre as proteínas envolvidas na regulação gênica, os fatores de transcrição são de fundamental importância, uma vez que atuam como interruptores moleculares para regular a expressão de seus genes-alvo, interagindo com os elementos *cis* nos promotores de genes por se ligarem a regiões promotoras dos genes permitindo o reconhecimento e ligação de RNA polimerases para que a transcrição ocorra (Singh et al., 2002). Os fatores de transcrição WRKY pertencem a uma grande família gênica presentes em uma ampla gama de plantas e inclusive em algas (Zhang e Wang, 2005).

A mais proeminente característica da família de genes WRKY é a presença de um ou dois domínios que consistem em aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos com uma sequência altamente conservada, “WRKYGQK”, na posição N-terminal da proteína (Eulgem et al., 2000). As proteínas WRKY ligam-se à porção W-box ((C/T)TGAC(T/C)) dos seus genes alvo (Ciolkowski et al., 2008), bem como à porção SURE (*sugar responsive*) que desempenha um papel na promoção da transcrição (Sun et al., 2003). Em estudo anterior (Wei, 2016), foram identificados e caracterizados 62 genes pertencentes a família gênica WRKY presentes à espécie de morango selvagem (*Fragaria vesca*). Chen & Liu (2019) identificaram um total de 47 membros da família WRKY em *Fragaria x ananassa*. Em nosso estudo, utilizando transcriptoma *in house*, identificamos 64 *FaWRKYs* putativas das quais foram caracterizadas quanto a presença de elementos *cis* regulatórios

2. METODOLOGIA

2.1. Identificação de genes WRKY em *Fragaria x ananassa*

Para identificar WRKYs em *Fragaria x ananassa* foram utilizados bancos de mRNA-Seq depositados no Genome Database for Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>) e bancos de mRNA-Seq *in house*. Sequências WRKY em *Fragaria vesca* disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram utilizadas. A busca de sequências homólogas nos bancos de dados mRNA-Seq foi realizada usando sequências não redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do banco de dados Swiss-prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), aplicando o programa BLASTX (e-value<1e-6). As sequências putativas foram traduzidas em peptídeos do maior 'open reading frame' (quadro de leitura aberto) usando a ferramenta ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Posteriormente, a presença de um ou dois domínios característicos da família de genes WRKY foram verificadas por meio das ferramentas online do PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) com o objetivo de confirmar cada sequência putativa.

2.2. Predição de elementos cis

Para identificar potenciais elementos *cis* nos promotores dos genes WRKY, as sequências de 2000 pb a montante das regiões codificantes dos genes *FaWRKY* foram primeiro obtidas usando o TBtools e depois submetidas ao banco de dados PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Os elementos *cis* foram analisados e visualizados por TBtools (Chen et al., 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a pesca de sequências putativas de *FaWRKY* e da verificação da presença de domínios característicos, identificou-se um total de 64 genes pertencentes à família gênica WRKY, presentes em morango (*Fragaria x ananassa*). Para entender os papéis dos elementos *cis* reguladores em *FaWRKYs*, os elementos *cis* foram identificados na sequência *upstream* de 2 kb do local de início da tradução (ATG) de cada gene *FaWRKY* usando o software PlantCARE. Neste estudo, vários elementos *cis* foram encontrados em 61 dos 64 genes *FaWRKY*. Todos os elementos *cis* detectados podem ser classificados em 16 tipos de acordo com suas funções (Figura 1).

Nesse sentido, em morango, o tratamento com MeJA foi associado ao aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo do pigmento, metabolismo do açúcar, amaciamento de frutas e metabolismo hormonal, e de antocianinas (Han et al., 2019). Anteriormente, *MaWRKY62* e *70*, de frutos de banana, mostraram-se responsivos ao fitormônio metil jasmonato (MeJA), conferindo maior resistência a *Colletotrichum musae* (Tang et al., 2013). Nesse sentido, Li et al., 2015 provaram o envolvimento de várias WRKYs em papéis cruciais em crisântemo; *CmWRKY21* provou ser induzido pelo estresse de salinidade e suprimido pela exposição a altas temperaturas; *CmWRKY22* foi induzido por exposição a altas temperaturas; *CmWRKY40* é expresso em condição de estresse salino e tratamento com ácido abscísico (ABA) ou MeJA; *CmWRKY42* foi regulado positivamente pelo estresse de salinidade, baixa temperatura, tratamento com ABA e MeJA e infestação de pulgões, enquanto *CmWRKY48* foi induzido por estresse hídrico, tratamento com ABA e MeJA e

infestação de pulgões. Visto a presença de cis-elementos responsivos a MeJA e a presença de domínios conservados entre espécies é provável que efeitos semelhantes aos relatados na literatura ocorram em *F. ananassa*.

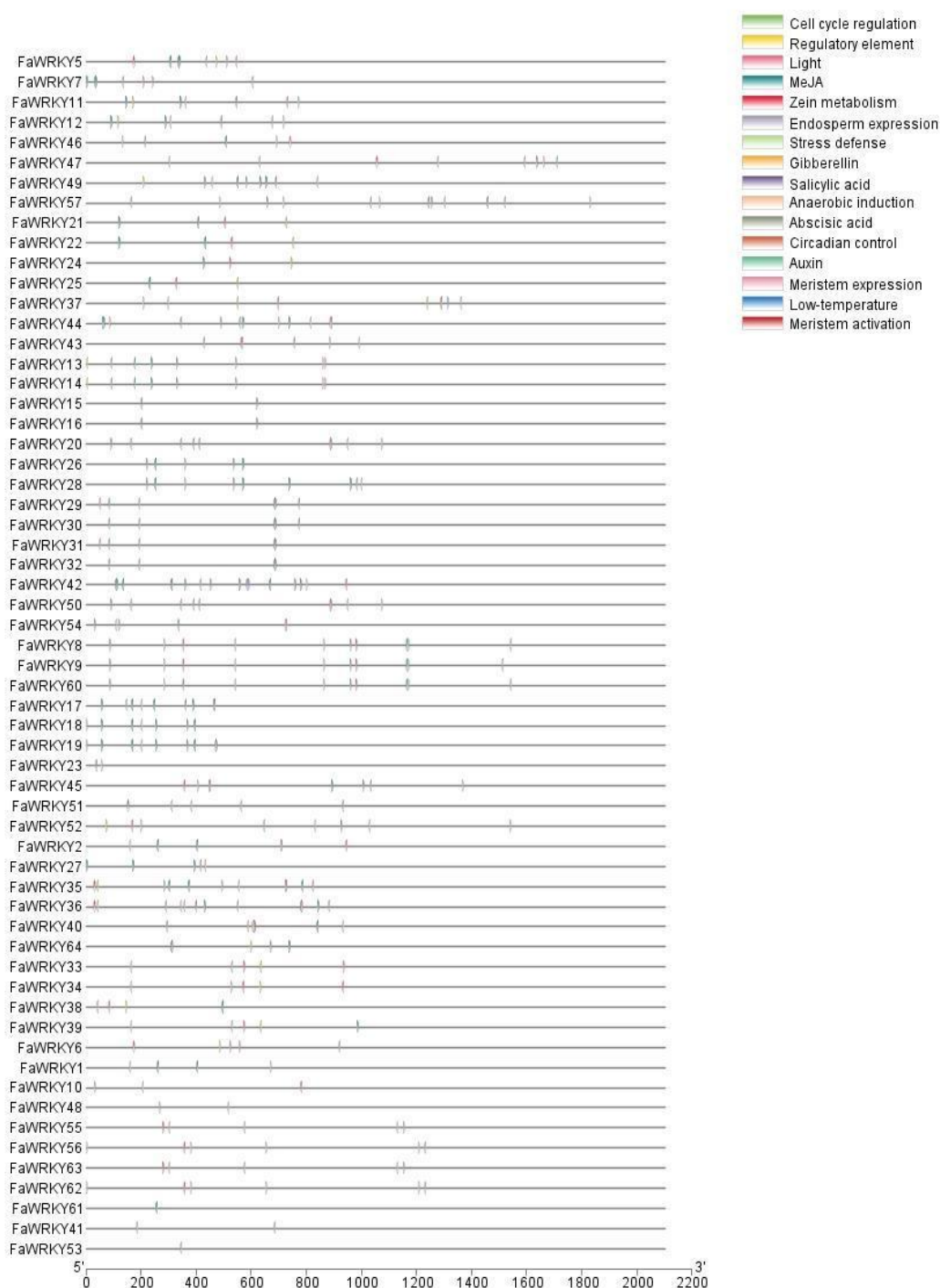


Figura 1. Análise de elementos cis regulatórios dos genes WRKY em morangoeiro (*Fragaria x ananassa*).

Fatores de transcrição WRKY são, também, destacados em vias de sinalização responsivas à ABA, onde atuam em vários níveis (Rushton et al., 2011). Em *Arabidopsis*, WRKYs parecem atuar a jusante de pelo menos dois receptores ABA: estudos de ligação ao promotor in vivo e in vitro mostram que os genes-alvo para WRKYs que estão envolvidos na sinalização ABA incluem genes

responsivos a ABA bem conhecidos, como ABF2, ABF4, ABI4, ABI5, MYB2, DREB1a, DREB2a e RAB18 (Rushton et al., 1995). Genes adicionais induzíveis por estresse bem caracterizados, como RD29A e COR47 também são encontrados em vias de sinalização a jusante de WRKY (Ren et al., 2010). TFs WRKY são, também, reguladores positivos do fechamento estomático mediado por ABA e, portanto, das respostas à seca (Ren et al., 2010). Por outro lado, muitos WRKY TFs são reguladores negativos da germinação de sementes, e o controle da germinação de sementes parece uma função comum de um subconjunto de WRKY TFs em plantas com flores (Jiang e Yu, 2009; Ren et al., 2010; Shang et al., 2010).

Há evidências de que uma das vias de indução de fenilpropanóides é dependente do ácido abscísico (ABA) e é gerada por uma cascata de sinalização envolvendo cálcio (Ca^{2+}) e proteínas quinases dependentes de proteínas (CDPKs) que são comumente reguladas por fatores de transcrição WRKY (Vighi et al., 2019; Wen et al., 2020). A presença de cis-elementos reponsivos a ABA nos genes identificados no presente estudo, corrobora na possível relação desses TFs nesse processo. Assim como TFs WRKY de outras espécies como *SIWRKY23* em tomate têm expressão induzida por estresse osmótico. Esse gene confere tolerância ao estresse por manitol e NaCl por meio da interação das vias de auxina e etileno. Essas interações são também responsáveis por alterar o crescimento da raiz primária e lateral (Singh et al., 2023). Em arroz (*Oryza sativa*), *OsWRKY71* codifica um repressor transcricional da sinalização GA em células de aleuroma. Elementos cis-regulatórios indicam funções semelhantes em cópias *FaWRKY*.

4. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou a identificação de 64 genes *FaWRKYs* bem como inferir a presença de elementos cis-regulatórios. Futuros estudos serão direcionados à determinação da função destas cópias gênicas visando a seleção de genes promissores para o desenvolvimento de plantas tolerantes e/ou resistentes a estresses, através da modulação da expressão gênica

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NEZHADAHMADI, A., FARUQ, G., RASHID, K., 2015. The impact of drought stress on morphological and physiological parameters of three strawberry varieties in different growing conditions. **Pak. J. Agric. Sci.** 52, 79e92.
- KIRNAK, H., KAYA, C., HIGGS, D., GERCEK, S., 2001. A long-term experiment to study the role of mulches in the physiology and macro-nutrition of strawberry grown under water stress. **Aust. J. Agric. Res.** 52, 937e943.
- JANG, J.Y., CHOI, C.H., HWANG, D.J., 2010. The WRKY superfamily of rice transcription factors. **Plant Pathol. J.** 26, 110e114.
- ZHANG, Y.J., WANG, L.J., 2005. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evol. Biol.** 5.
- EULGEM, T., RUSHTON, P.J., ROBATZEK, S., SOMSSICH, I.E., 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends Plant Sci.** 5, 199e206.
- CIOLKOWSKI, I., WANKE, D., BIRKENBIHL, R.P., SOMSSICH, I.E., 2008. Studies on DNAbinding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. **Plant Mol. Biol.** 68, 81e92.
- SUN, C.X., PALMQVIST, S., OLSSON, H., BOREN, M., AHLANDSBERG, S., JANSSON, C., 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. **Plant Cell** 15, 2076e2092.