

WRKYs em *Fragaria x ananassa*: identificação e relações filogenéticas

AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO¹; ROSANE LOPES CRIZEL²; ISABEL LOPES VIGHI³ E VANESSA GALLI⁴

¹Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPEl) –
audreydadycn@hotmail.com

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

³Laboratório de Bioinformática e Protômica – Biotecnologia – CDTec (UFPEl) –
isavighi@hotmail.com

⁴Grupo 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 por se ligarem a regiões promotoras dos genes permitindo o reconhecimento e ligação de RNA polimerases para que a transcrição ocorra. 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*). No entanto, apenas uma cópia havia sido identificada e caracterizada em *Fragaria x ananassa* (*FaWRKY1*) que, de acordo com Encinas-Villarejo *et al.* (2009), desempenha um importante papel regulador na resistência a patógenos.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo identificar genes pertencentes a família gênica WRKY em *Fragaria x ananassa*, bem como inferir relações filogenéticas entre os genes identificados.

2. METODOLOGIA

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

Para realizar a busca por *WRKYs* em *Fragaria x ananassa* foram utilizados bancos de RNAseq depositados no Genome Database for Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>), e bancos de *RNAseq in house*. Como iscas, foram utilizadas sequências *WRKYs* de *Fragaria vesca* disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A busca por sequências homólogas nos bancos de RNAseq foi realizada utilizando sequências não redundantes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e do banco de dados do Swiss-prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>), aplicando o programa BLASTX (e-value<1e-6). As sequências putativas foram traduzidas em peptídeos a partir do maior 'open reading frame' (fase aberta de leitura) utilizando a ferramenta ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Posteriormente, a presença de um ou dois domínios característicos da família gênica das *WRKY* foi verificada utilizando a ferramentas on-line PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>), objetivando a confirmação de cada sequência putativa.

2.2. Análise filogenética

Todos os genes *WRKY* identificados foram classificados em diferentes grupos segundo o esquema de classificação de domínios *WRKY* em *Arabidopsis thaliana* (AtWRKY), de acordo com Eulgem *et al.* (2000). O alinhamento das sequências identificadas e das sequências *FvWRKY* previamente descritas foi realizado na ferramenta Clustal X 2.147, utilizando as configurações padrão. A fim de aferir as relações evolutivas entre estas sequências, uma árvore filogenética foi criada utilizando o método *neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*, na ferramenta *ItoI* (<https://itol.embl.de/tree>).

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*). Sendo que 53 dessas sequências apresentam apenas um domínio característico, sete apresentam dois domínios e quatro apresentam dois domínios mais um receptor treonina quinase do tipo II. A proteína *FaWRKY57* apresentou maior número de aminoácidos (626 aa), enquanto que a *FaWRKY23* foi a proteína que apresentou o menor tamanho (81 aa).

Como resultado da análise filogenética (Figura 1), utilizando a sequência aminoacídica traduzida pelos genes *FvWRKY* e *FaWRKYs*, pode-se observar a formação de três grupos (I, II e III), com cinco subgrupos no grupo II (IIa, IIb, IIc, IId e IIe). Desta forma, 17 *FvWRKYs* e 17 *FaWRKYs* pertencem ao grupo I; três *FvWRKYs* e três *FaWRKYs* ao subgrupo IIa; 15 *FvWRKYs* e 11 *FaWRKYs* ao subgrupo IIb; nove *FvWRKYs* e 10 *FaWRKYs* ao subgrupo IIc; seis *FvWRKYs* e seis *FaWRKYs* ao subgrupo IId; quatro *FvWRKYs* e seis *FaWRKYs* ao subgrupo IIe; e seis *FvWRKYs* e sete *FaWRKYs* ao grupo III.

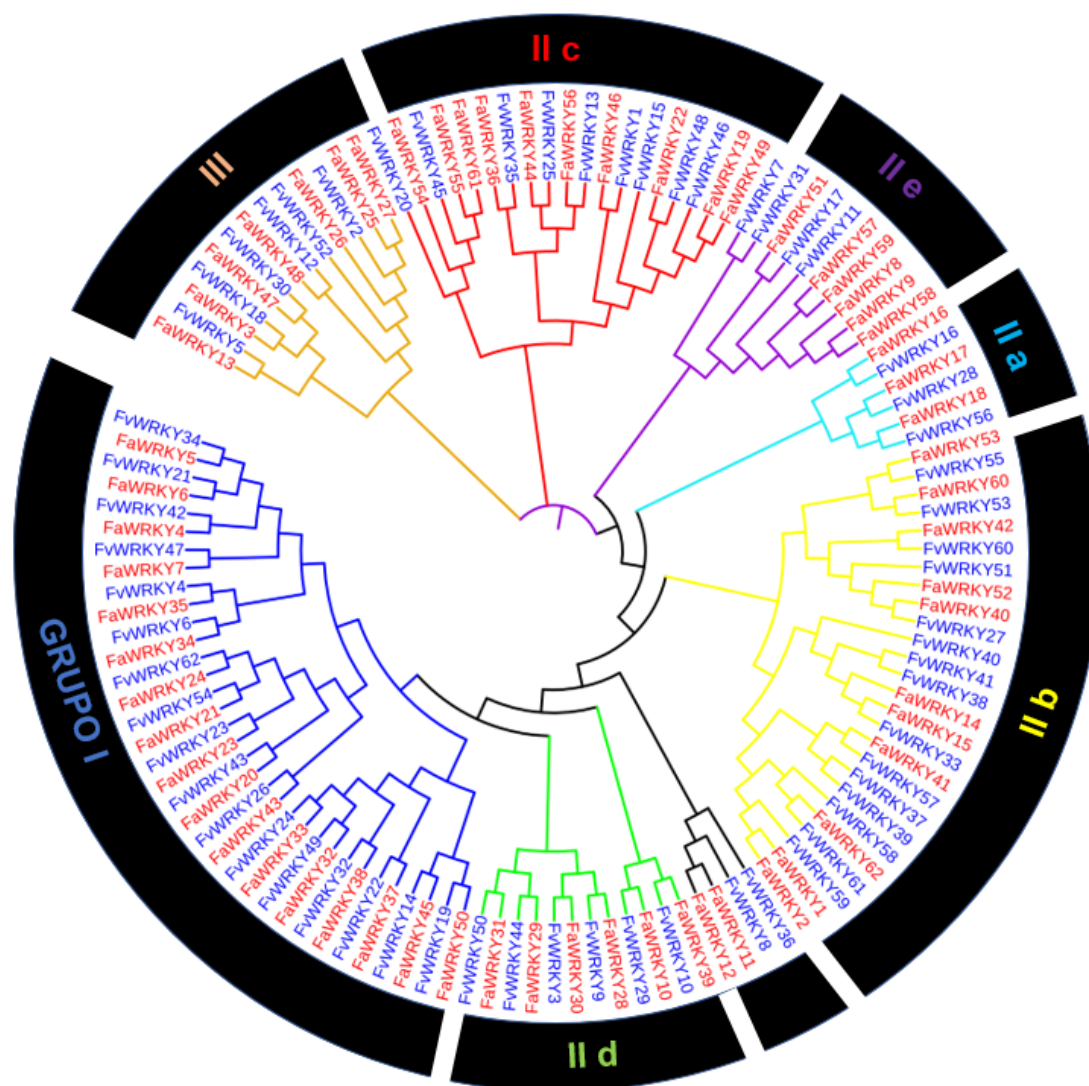


Figura 1. Análise filogenética de genes *WRKY* de morango. As sequências completas de aminoácidos traduzidas pelos genes *WRKY* em *Fragaria x ananassa* (Fa - vermelho) e *F. vesca* (Fv - azul) foram alinhados usando ClustalX, e a árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining* com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando a ferramenta *Itol*. Os ramos da árvore foram coloridas para indicar os diferentes subgrupos formados.

Wei (2016) sugere que várias cópias de *FvWRKY* estão envolvidas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Em condições de déficit hídrico, 29 *FvWRKYs* aumentaram a expressão comparados ao tratamento controle, sendo que *FvWRKY23* foi a cópia com maior nível de expressão neste tratamento. Uma vez que o gene *FaWRKY23* possui alta homologia com o gene *FvWRKY23*, sugere-se que em *Fragaria x ananassa* essa cópia também possa desempenhar importante papel na tolerância ao déficit hídrico.

Através de análise de interactoma, Wei (2016) aponta ainda que algumas proteínas *WRKYs* presentes em *Fragaria vesca* interagem com proteínas VQ (MKS1, SIB1 e SIB2), que são envolvidas na regulação da resposta de defesa das plantas; MPK3 e MPK4, as quais apresentam papel na resposta de plantas a patógenos e condições de estresse; e STZ, que estão envolvidas em respostas a estresse abiótico. O que sugere novamente que *FaWRKYs* poderiam desempenhar papéis versáteis em resposta a estresses.

No grupo IIc estão presente os genes *FvWRKY46* e *FvWRKY48*, os quais apresentaram aumento na expressão durante o desenvolvimento do fruto em estudo desenvolvido por Zhou (2016), e com isso foi atribuído a essas cópias um

possível papel na regulação do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. Estas sequências apresentaram alta homologia aos genes *FaWRKY19*, *FaWRKY22* e *FaWRKY49*, sugerindo que estes possam também ter importante papel nesse processo. No entanto, é importante salientar que, apesar de a homologia entre sequências ser indicativo de sua função, a mesma deve ser confirmada em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou a identificação de 64 genes *FaWRKYs* bem como inferir relações filogenéticas entre estas sequências e as descritas em *F. vesca*. 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.
- ENCINAS-VILLAREJO, S., MALDONADO, A.M., AMIL-RUIZ, F., DE LOS SANTOS, B., ROMERO, F., PLIEGO-ALFARO, F., MUNOZ-BLANCO, J., CABALLERO, J.L., 2009. *Evidence for a positive regulatory role of strawberry (Fragaria xananassa) Fa WRKY1 and Arabidopsis at WRKY75 proteins in resistance*. **J. Exp. Bot.** **60**, 3043e3065.
- WEI, W., HU, Y., HAN, Y.-T., ZHANG, K., ZHAO, F.-L., & FENG, J.-Y. (2016). *The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry Fragaria vesca : Identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses*. **Plant Physiology and Biochemistry**, **105**, 129–144.