

ANÁLISE EVOLUTIVA DE GENES *WRKY* EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ORYZA*

JENNIFER LUZ LOPES¹; KARINE ELISE JANNER DE FREITAS²; VÍVIAN
EBELING VIANA²; ALICE PEREIRA DE JESUS²; CAMILA PEGORARO²;
ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – jenniferlopesagronomia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karinejanner@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vih.viana@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alice.pereira@hotmail.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – acostol@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos mundialmente. Pertencente à família *Poaceae*, o gênero *Oryza* é composto por 23 espécies distribuídas em diversas regiões do mundo. No entanto, apenas duas espécies são cultivadas, *O. sativa* L., arroz asiático cultivado e *O. glaberrima* Steud., arroz africano cultivado (VAUGHAN; CHANG, 1995). As espécies do gênero são diferenciadas de acordo com seu genoma e agrupadas em quatro complexos conforme Vaughan et al. (2005), sendo *O. sativa* ssp. *indica*, *O. sativa* ssp. *japônica*, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis*, *O. rufipogon* e *O. nivara* com genoma (AA), *O. brachyantha* com genoma (FF) e *O. punctata* com genoma (BB).

Ao longo do processo evolutivo as plantas se adaptaram as variações ambientais, por serem organismos sésseis e autotróficos, percebem as tensões através complexas redes de transdução de sinais e desenvolveram estratégias específicas e eficientes de defesa para assim conferir a tolerância aos estresses (DOU et al., 2016). Neste contexto, os fatores de transcrição (FTs) são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA e regulam a expressão gênica, desempenham papel fundamental na ativação ou repressão da transcrição de genes alvo (PAN et al., 2010). Dentre esses, está a família de FTs *WRKY* que são considerados reguladores positivos ou negativos e desempenham um papel regulador em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento nas plantas (HE et al., 2017).

Na proteína, o domínio *WRKY* é formado por uma região altamente conservada de 60 aminoácidos, com um fragmento conservado *WRKYGGQK* na região N terminal, seguido por um motivo dedo de zinco Cx4-5Cx22-23HxH ou Cx7Cx23HxC (EULGEM et al., 2000). Para aprofundar os estudos evolutivos, análises filogenéticas foram realizadas, e a família de proteínas *WRKY* em plantas superiores foi dividida com base no número de domínios e no tipo de motivos dedo de zinco em três grupos: Grupo I, Grupo II e Grupo III (RUSHTON et al., 2010). Em inúmeras espécies de plantas, a identificação e classificação dos genes já foi realizada. Em *Oryza sativa*, 125 membros foram encontrados (RICE *WRKY* WORKING GROUP, 2012), no entanto esses estudos devem ser difundidos para as demais espécies do gênero *Oryza*.

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil evolutivo de genes *WRKY* no genoma de 11 espécies de *Oryza* através da análise filogenética.

2. METODOLOGIA

Neste estudo as sequências de cinco genes da família dos fatores de transcrição WRKY em *Oryza sativa* subespécie *japonica*, foram obtidas explorando o banco de dados *The Rice Annotation Project Database*- RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>). Posteriormente realizou-se um BLASTn dentro do banco de dados *ENSEMBL PLANTS* (<http://plants.ensembl.org/index.html>) contra o genoma de todas as espécies do gênero *Oryza* disponíveis no banco, dessa forma, foram analisadas 11 espécies. Para realizar a análise de filogenia, primeiramente as sequências foram submetidas a um alinhamento global com ClustalW (LARKIN et al., 2007) no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*- MEGA 7 (versão 7.0.26) (KUMAR et al., 2016), no qual o alinhamento foi exportado e salvo em formato fasta. A escolha do melhor modelo para construção da árvore filogenética foi realizada com auxílio do programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016) e o modelo escolhido foi T-92 Tamura 3-parameter. À árvore filogenética foi gerada utilizando a metodologia Bayesiana através do programa BEAST (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007), com a opção de *bootstrap* (1.000.000) réplicas. Foi realizada uma análise de domínios proteicos, no qual as sequências de proteína de cada gene WRKY identificado nas 11 espécies do gênero *Oryza* foram inseridas no programa *Simple Modular Architecture Research Tool*- SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), para posterior avaliação da estrutura proteica (SCHULTZ et al., 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise filogenética inclui as sequências de cinco genes *WRKY45*, *WRKY71*, *WRKY74*, *WRKY76* e *WRKY94*, de 11 espécies do gênero *Oryza*. Através dessa análise foi possível observar a formação de dois clados quando realizada a análise evolutiva desses genes (Figura 1).

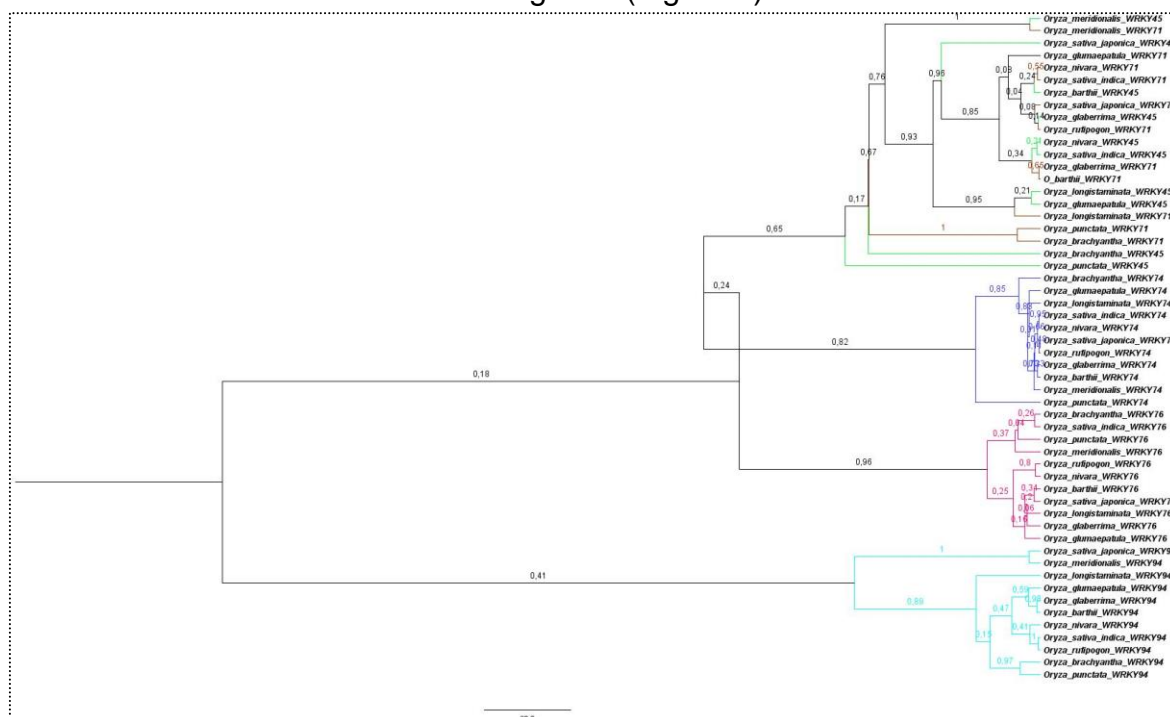


Figura 1: Árvore filogenética de genes *WRKY* no gênero *Oryza*.

Os genes da família *WRKY* são classificados de acordo com o número do seu domínio proteico e características dos motivos dedos de zinco em três grupos distintos: Grupo I, II e III (EULGEM et al., 2000). Diante disso, no primeiro clado estão contidos os genes *WRKY45*, *WRKY71* e *WRKY74* (Figura 1), que se classificam no grupo II, por possuírem somente um domínio *WRKY* em sua estrutura (Figura 2A).

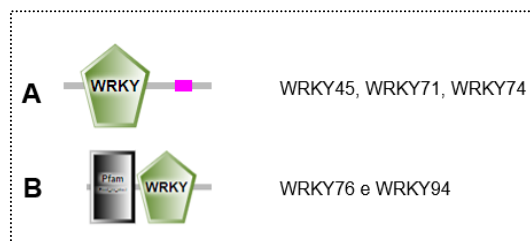


Figura 2: Domínio proteico dos produtos dos genes *WRKY45*, *WRKY71* e *WRKY74* (A), domínio proteico dos produtos dos genes *WRKY76* e *WRKY94* (B) em espécies do gênero *Oryza*.

Observa-se a formação de um ramo misto entre os genes *WRKY45* e *WRKY71*, que apontam para uma variação na conservação desses genes nas diferentes espécies de *Oryza*. Isso indica que as proteínas codificadas por estes genes podem ter relação próxima devido as características similares que apresentam. Estudos realizados por Pandey et al. (2009) apontam que a superexpressão dos genes *WRKY45* e *WRKY71* conferem resistência de plantas a fungos patogênicos, demonstrando assim que esses genes medeiam as respostas das plantas a vários estresses e auxiliam na elucidação de outros estudos mais aprofundados nas demais espécies do gênero. Por outro lado, o gene *WRKY74* se mantém altamente conservado entre as diferentes espécies do gênero. Ainda no primeiro clado, temos agrupado o gene *WRK76* sendo este bastante conservado em relação aos outros genes *WRKY*. Apesar desse gene estar agrupado com os genes que codificam proteínas do grupo II, a proteína *WRKY76* apresenta dois domínios em sua estrutura, sendo então uma proteína do grupo I.

No segundo clado, apresenta-se apenas o gene *WRKY94* (Figura 1), classificado no grupo I, com dois domínios identificados (Figura 2B). Além disso, este gene foi conservado entre as 11 espécies de *Oryza*. Em um estudo baseado em uma análise filogenética nas subespécies *indica* e *japonica* de arroz, aponta-se que os genes *WRKY93* e *WRKY94* são genes duplicados, uma vez que o produtos destes genes possuem dois domínios e estão agrupados em um mesmo clado (JIMMY; BABU, 2019). Ainda, WU et al., (2005) relataram eventos de duplicação em tandem ocorridos nos arranjos dos genes *WRKY* em *O. nivara*, o que também foi observado em outras espécies de plantas.

Considerando a importância e o tamanho da família gênica *WRKY* nas diferentes espécies do gênero *Oryza*, a identificação e compreensão dos processos evolutivos que são controlados pelas proteínas codificadas por estes genes continuará a ser um grande desafio para os próximos anos. Mais estudos deverão ser realizados quanto a conservação, divergência e análise funcional dos genes *WRKY*.

4. CONCLUSÕES

Os genes *WRKY74*, *WRKY76* e *WRKY94* apresentam-se altamente conservados nas 11 espécies do gênero *Oryza* avaliadas neste estudo. Já os genes *WRKY45* e *WRKY71* apresentaram variações na sua conservação e deverão ser mais estudados, tanto com relação a sua história evolutiva como possível fonte de variabilidade para a tolerância aos estresses abióticos e bióticos em arroz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOU, L.L.; GUO, Y.N.; ONDATI, E.; EPANG, C.Y.; WEI, H.L.; SONG, M.Z.; FAN, S.L.; YU, S.X. Identification and expression analysis of group III WRKY transcription factors in cotton. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 11, p. 2469-2480, 2016.
- EULGEM, T.; RUSHTON, P.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 199-206, 2000
- HE, C.; SILVA, T.J.; TAN, J.; PAN, X.; LI, M.; LUO, J.; DUAN, J. A Genome-Wide Identification of the WRKY Family Genes and a Survey of Potential WRKY Target Genes in *Dendrobium officinale*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9200, 2017.
- JIMMY, J. L.; BABU, S. Variations in the Structure and Evolution of Rice WRKY Genes in *Indica* and *Japonica* Genotypes and their Co-expression Network in Mediating Disease Resistance. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 15, n. 5, p. 1-12, 2019.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; THOMPSON, J. D. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.
- PANDEY, S.P.; SOMSSICH, I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. **Plant Physiol**, v.150, n.4, p.1648-1655, 2005.
- PANDEY, S.P.; SOMSSICH, I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. **Plant Physiology**. V.150, n.4, p. 1648-1655, 2009;
- PAN, Y.; TSAI, C.J.; MA, B.; NUSSINOV, R. Mechanisms of transcription factor selectivity. **Cell**, v. 26, n. 2, p. 75–83, 2010.
- RICE WRKY WORKING GROUP. Nomenclature report on rice WRKY's - Conflict regarding gene names and its solution. **Rice**, v. 5, n. 3, p. 2004–2006, 2012.
- RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E.; RINGLER, P.; SHEN, Q.J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v.15, n.5, p. 247-258, 2010.
- SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc.Natl.cad.Sci. USA**, v.95, p. 5857-5864, 1998.
- VAUGHAN, D.A.; CHANG, T.T. Collecting the rice gene pool. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; REID, R. **Collecting plant genetic diversity: technical guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995.
- VAUGHAN, D.A.; KADOWAKI, K.I.; KAGA, A.; TOMOOKA, N. On the Phylogeny and Biogeography of the Genus *Oryza*. **Breeding Science**, v. 122, n. 55, p. 113-122, 2005.
- WU, K.; GUO, Z.J.; WANG, H.H.; LI, J. The WRKY Family of Transcription Factors in Rice and *Arabidopsis* and Their Origins. **DNA Research**, v. 26, n. 12, p. 9–26, 2005.