

## FATORES DE TRANSCRIÇÃO WRKY EM *Fragaria x ananassa*: CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PLANTAS SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS

ROSANE LOPES CRIZEL<sup>1</sup>; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO<sup>2</sup>;  
VANESSA GALLI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – DCTA (FAEM- UFPel) –  
[rosanecrizel1@hotmail.com](mailto:rosanecrizel1@hotmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal – DCTA (FAEM- UFPel) – [audredadycn@hotmail.com](mailto:audredadycn@hotmail.com)

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal – CDTec – UFPel – [vane.galli@yahoo.com.br](mailto:vane.galli@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa*) é uma espécie de importância econômica, pois gera renda para produtores, processadores e comerciantes. É um fruto amplamente consumido em função das características sensoriais, principalmente, da coloração, sabor e aroma (SCHAART et al., 2013). Além disso, é rico em compostos bioativos, com destaque para o ácido ascórbico e compostos fenólicos, dentre esses os ácidos fenólicos e as antocianinas (GIAMPIERI et al., 2017). No entanto, as plantas de morango encontram-se constantemente submetidas a estresses bióticos e abióticos que influenciam no rendimento e na qualidade dos frutos. Para se adaptar aos desafios bióticos e abióticos recorrentes, as plantas devem regular a expressão gênica e neste processo, os fatores de transcrição desempenham um papel crucial (JANG; CHOI; HWANG, 2010). Dentre os vários fatores de transcrição, os fatores de transcrição WRKY funcionam como importantes reguladores (ZHANG; WANG, 2005).

Os membros da classe de fatores de transcrição WRKY, são ubíquos entre as plantas, se ligam a sequência específica de DNA e são capazes de ativar ou reprimir a transcrição de genes alvo a jusante (ZHOU et al., 2016). As proteínas desta superfamília contêm um ou dois domínios altamente conservados, que consistem em aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, incluindo a sequência de WRKYGQK no N-terminal, além de uma estrutura de dedo de zinco na região C-terminal. A conservação do domínio WRKY influencia na conservação de seu sítio de ligação, a caixa W (TTGACC / T). O domínio WRKY facilita a ligação da proteína a caixa W ou ao elemento SURE (elemento cis-responsivo ao açúcar) nas regiões promotoras dos genes alvo (SUN, 2003).

As proteínas WRKY estão associadas a processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, síntese de metabólitos secundários, resposta a fatores bióticos e abióticos. A exemplo disso, em *Arabidopsis AtWRKY46*, juntamente com *AtWRKY70* e *AtWRKY53* regulam positivamente a resistência basal a *Pseudomonas syringae* (HU; DONG; YU, 2012). Em arroz, por sua vez, *OsWRKY30* desempenha importante papel na tolerância à seca (SHEN et al., 2012). De forma similar, em videira, o fator de transcrição *VvWRKY8* é responsável por regular a via biosintética de resveratrol (Res), um composto fenólico responsável por respostas a estresses bióticos e abióticos (JIANG et al., 2019).

Recentemente, a identificação e análise de expressão sob estresses bióticos e abióticos da família genica WRKY foi realizada em morango (*Fragaria*

vesca) (ZHOU et al., 2016; WEI et al., 2016). No entanto, ainda não está disponível a caracterização da família genica WRKY em morango (*Fragaria x ananassa*). Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão transcricional das WRKY em morango (*Fragaria x ananassa*) sob condições de déficit hídrico e salinidade.

## 2. METODOLOGIA

### Identificação de genes de WRKY em morango

Para buscar os genes putativos *FaWRKY*, foram utilizados o banco de dados Genome Database for Rosaceae (GDR) (<https://www.rosaceae.org/>), e os bancos de RNAseq *in house*. Foram utilizadas como iscas sequencias WRKYS de *Fragaria vesca* disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A busca por sequencias homólogas nos bancos de RNAseq foi realizada utilizando sequencias 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 sequencias putativas foram traduzidas em peptídeos a partir do maior “open reading frame” utilizando a ferramenta ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Para verificar a confiabilidade destas sequências candidatas, verificou-se a presença de um ou dois domínios característicos da família gênica das WRKY, utilizando a ferramenta PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

### Análise de expressão in silico utilizando bancos de mRNA-Seq

A expressão in silico foi realizada com três bancos de mRNA-Seq: controle - obtidos a partir de frutos de morango maduros sem tratamento; estresse salino – obtido a partir de frutos maduros de morango cultivados sob condições de estresse salino (NaCl); e estresse hídrico – obtido a partir de frutos maduros de morango cultivados sob condições de restrição hídrica. Estes bancos estão depositados no GEO (Gene Expression Omnibus), sob o número SRA: SRP082122, e a metodologia utilizada para sua obtenção está descrita em Galli et al. (2018). Para isso, o software Bowtie (version 0.12.7) (Langmead et al. 2009) foi utilizado para mapear os *reads* de cada um dos três bancos às sequências de *FaWRKY* preditas. Posteriormente, os *reads* foram contados usando a ferramenta SAMtools (version 0.1.16). O método de normalização de escala proposto por Robinson e Oshlack (2010) foi utilizado para a normalização dos dados. O resultado foi apresentado utilizando um mapa de calor (*heat map*), o qual foi construído utilizando a ferramenta MeV ([mev.tm4.org](http://mev.tm4.org))

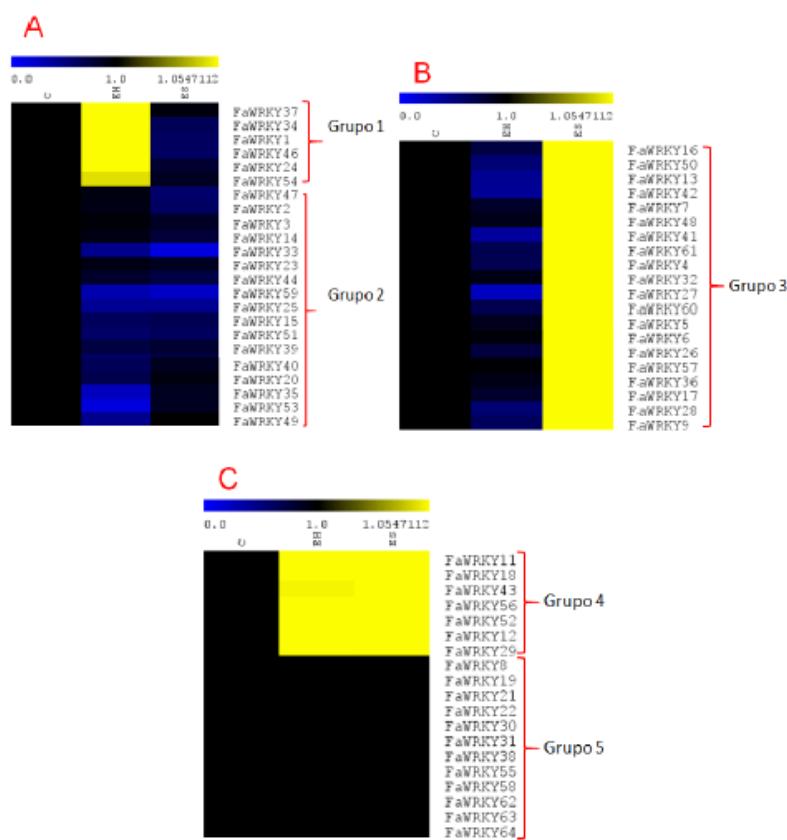
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As WRKYS vem sendo relatadas como fatores essenciais na regulação da tolerância das plantas frente a situações de estresses bióticos e abióticos (XU et al., 2016). Baseado nas informações do Genome Database for Rosaceae (GDR) e do banco de mRNA-Seq *in house* identificou-se um total de 64 genes pertencentes à família gênica WRKY, presentes em morango (*Fragaria x ananassa*).

O perfil de expressão gênica in silico das *FaWRKYs* em resposta a estresses por déficit hídrico e salinidade revelou que a expressão de 50 *FaWRKYs* foi alterada em função dos tratamento (Figura 1). Resultados similares foram observados em *Fragaria vesca*, em que a expressão gênica de 49 genes de

WRKY foram alteradas em resposta a estresse abiótico e biótico (WEI et al., 2016), sugerindo que genes WRKY desempenham papéis importantes na adaptação ambiental do morango.

Neste estudo, foram observados cinco grupos de comportamento: o grupo 1, formado por 6 genes que se mostraram *upregulated* em estresse hídrico e *downregulated* ou sem expressão diferencial para estresse salino; o grupo 2 formado por 18 genes que se mostram *downregulated* tanto em estresse hídrico como salino, ou sem expressão diferencial em um deles; o grupo 3, formado por 20 genes que se mostraram *upregulated* para estresse salino e *downregulated* ou sem expressão diferencial estresse hídrico e, por isso, possivelmente estão associados com resposta à toxicidade ao NaCl; o grupo 4, formado por 7 genes que se mostraram *upregulated* em ambos os estresses comparados ao controle, indicando estarem associados à resposta osmótica oriunda de ambos estresses e; o grupo 5, composto por 12 genes que não apresentaram expressão diferencial em nenhuma das duas condições.



**Figura 1.** Mapa de cor (Heat map) mostrando a expressão de fatores de transcrição do tipo WRKY em frutos submetidos a condições de estresse osmótico. Sendo C - controle, EH - estresse hídrico e ES – estresse salino.

#### 4. CONCLUSÕES

As análises de expressão gênica *in silico* permitiram constatar uma relação entre os fatores de transcrição do tipo WRKY com resposta a estresse salino e hídrico. Estes resultados contribuirão para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas com o objetivo de obter cultivares tolerantes a estresses osmóticos. 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.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GALLI, V. et al. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, 2018.
- GIAMPIERI, F. et al. Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. **Food Chemistry**, v. 234, p. 464–471, 2017.
- HU, Y.; DONG, Q.; YU, D. Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v. 185–186, p. 288–297, 2012.
- JANG, J. Y.; CHOI, C. H.; HWANG, D. J. The WRKY superfamily of rice transcription factors. **Plant Pathology Journal**, v. 26, n. 2, p. 110–114, 2010.
- JIANG, J. et al. VvWRKY8 represses stilbene synthase genes through direct interaction with VvMYB14 to control resveratrol biosynthesis in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 2, p. 715–729, 2019.
- SCHAART, J. G. et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 454–467, 2013.
- SHEN, H. et al. OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 3, p. 241–253, 2012.
- SUN, C. A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the iso1 Promoter. **the Plant Cell Online**, v. 15, n. 9, p. 2076–2092, 2003.
- WEI, W. et al. The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*: Identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 129–144, 2016.
- XU, H. et al. WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*. **DNA Research**, v. 23, n. 4, p. 311–323, 2016.
- ZHANG, Y.; WANG, L. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 1–12, 2005.
- ZHOU, H. et al. Genome-wide analysis of the expression of WRKY family genes in different developmental stages of wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–18, 2016.