

PREDIÇÃO DE MIRNAS QUE REGULAM FATORES DE TRANSCRIÇÃO TCPS EM *FRAGARIA X ANANASSA*

GUSTAVO HENRIQUE CAMOZATTO¹; RAFAEL ANDRADE PIRES²;
PEDRO LOPES REISSER³; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ⁴;
VANESSA GALLI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavocamozatto@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – zeucleio@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – christian.kun@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vanessagalli.ufrgs@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) tem se consolidado como um importante modelo biológico para investigação de eventos fisiológicos relacionados ao amadurecimento dos frutos não-climatéricos. Isso se deve a diferentes características, como porte pequeno, desenvolvimento relativamente rápido e a disponibilidade de informações genômicas em bancos de dados (HIRAKAWA et al., 2014).

As alterações fisiológicas que ocorrem ao longo do crescimento e desenvolvimento da planta são reguladas a nível transcricional, e dependem da atuação de diversos fatores de transcrição (FTs), proteínas que participam na regulação da expressão gênica pela ligação em regiões específicas do DNA, os “cis elementos” que estão presentes no promotor de genes. Os FTs em conjunto com outros cofatores promovem ou inibem o ataque da enzima RNA polimerase, responsável pela transcrição, tornando os FTs, importantes agentes na regulação gênica.

As TCPs, são uma família de FTs vegetais envolvidos em uma variedade de processos biológicos, como o desenvolvimento de flores e folhas em diferentes espécies de plantas (Palatnik et al., 2003; Feng et al., 2006; Bresso et al. 2018). Em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*), das 36 isoformas presentes nessa espécie, 3 são preferencialmente expressas em frutos e reguladas por FTs importantes no contexto da maturação (Parapunova et al., 2014). Entretanto pesquisas relacionando essa família com a maturação de frutos do gênero *Fragaria* ainda são escassos (Xie et al., 2020).

Os micro RNAs (miRNAs) fazem parte da classe de RNAs não codificantes e possuem de 20 a 14 nucleotídeos e estão envolvidos na regulação pós-transcricional em organismos eucariotos e são codificados pelos chamados genes *miRNA* (MIR) (WANG; MEI; REN, 2019). Em plantas, os miRNAs atuam como silenciadores de mRNAs citoplasmáticos por complementariedade de bases, podendo ocorrer a clivagem do mRNA ou a supressão da tradução (BUDAK; AKPINAR, 2015).

Estudos identificando possíveis miRNAs que estejam regulando transcritos de TCP em *Fragaria x ananassa* ainda não estão disponíveis na literatura. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo identificar possíveis miRNAs em *Fragaria x ananassa* responsáveis pela regulação pós-transcricional dos genes que compõem a família *FaTCP*.

2. METODOLOGIA

2.1 Predição de miRNAs

A predição de possíveis miRNAs responsáveis pela regulação pós-transcricional dos genes *FaTCPs* foi realizada através da ferramenta online psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/analysis>) (DAI, ZHAO, 2011). As sequências gênicas das *FaTCPs* para realização da análise foram obtidas no banco de fatores de transcrição vegetais PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada permitiu a identificação de sete miRNAs (miR5015b.1, miR838, miR2111.1, miR159, miR169.1, miR414.1 e miR165b) com potencial de influenciar o nível de expressão de nove TCPs. Os valores de expectativa (“Expect”) variaram de 4-5, e a maioria atua inibindo o mRNA através de clivagem (Tabela 1).

De acordo com o estudo de HAN et al., 2014, o Fve-miR5015b.1 é expresso em todos os tecidos da planta exceto no fruto e tem como alvo potencial fatores de transcrição através do mecanismo de clivagem. No presente trabalho, o miR5015b.1 se apresentou como possível regulador dos genes *FaTCP5*, *FaTCP10*, *FaTCP11* e *FaTCP12*.

O miR838 é preferencialmente expresso em folhas, apresentando uma baixa ou nenhuma expressão em outros tecidos. Além disso, este miRNA tem sido evidenciado atuando na regulação de múltiplos alvos em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Zingiber officinale*, entre outras espécies (MALLORY; ELMAYAN; VAUCHERET, 2008; SINGH; SRIVASTAVA; SHARMA, 2016; WANG et al., 2017), e tem sido associado a estresses, metabolismo de carboidratos e resposta imune em plantas. Esse miRNA pode estar relacionado também a regulação das *FaTCP6* e *FaTCP9* em morango.

O miR2111.1 apresentou uma alta expressão em folhas, uma média expressão em frutos e pouca expressão nos demais órgãos do morangueiro, o que demonstra sua atuação recíproca-específica (HAN et al., 2014). Os membros da família miR2111 são importantes na formação de nódulos em raízes de espécies leguminosas, os quais atuam na fixação de nitrogênio nessas espécies (ZHANG et al., 2021). A exemplo disso, em plantas de *Lotus japonicus*, as quais possuem 7 locus do miR2111, o silenciamento do gene que codifica para miR2111-5 resulta em formação prejudicada dos nódulos (OKUMA et al., 2020). O miR2111-1 apresentou um alto valor de expectativa em relação ao gene *FaTCP6*, indicando uma possível regulação do mesmo em *F. ananassa*.

Outro importante miRNA presente em *F. ananassa* evidenciado pelo estudo de HAN et al., 2014 é o miR159. Os membros da família miR159 são altamente conservados e estão presentes na maioria das plantas terrestres, tendo como principal alvo os genes *GAMYB*, que codificam para os FTs R2R3-MYB relacionados a transdução de sinal das giberelinas (MILLAR; LOHE; WONG, 2019). Embora altamente conservados, em *F. ananassa* os miR159 apresentam alterações nos nucleotídeos terminais (HAN et al., 2014). O miR159 possui um alto valor de expectativa com os genes *FaTCP7* e *FaTCP12*.

O miR169.1 é expresso em todos os tecidos de *F. ananassa* porém apresenta uma expressão mais intensa nos frutos. Esse miRNA está envolvido com estresse por seca em arroz (*Oryza sativa*) e estresse por baixas temperaturas em *Astragalus* (*Astragalus membranaceus*) (ABLA et al., 2019; ZHOU et al., 2010). Além deste, o miR165 é um importante miRNA para a formação do meristema apical e desenvolvimento do sistema vascular em *A. thaliana* (ZHOU et al., 2007). E em *F. ananassa*, o miR165b apresentou um alto valor de expectativa para o gene *FaTCP15*.

Em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas ao estresse salino, o miR414 apresentou uma taxa de expressão menor quando comparadas às plantas controle, sugerindo uma atuação nessa condição (MACOVEI; TUTEJA, 2012). No presente trabalho, o miR414.1 apresentou um valor de expectativa de 4.0 para o gene *FaTCP14*.

Tabela 1. miRNAs responsáveis pela regulação pós-transcricional de genes *FaTCP*.

NOME	miRNA	Expect	Tipo de inibição
FaTCP5	miR5015b.1	4.5	Clivagem
FaTCP6	miR838	4.0	Clivagem
	miR2111.1	5.0	Clivagem
FaTCP7	miR159	5.0	Clivagem
	miR169.1	5.0	Clivagem
FaTCP9	miR838	5.0	Tradução
FaTCP10	miR5015b.1	5.0	Clivagem
FaTCP11	miR5015b.1	4.0	Clivagem
FaTCP12	miR5015b.1	4.0	Tradução
	miR159	4.5	Clivagem
FaTCP14	miR414.1	4.0	Clivagem
FaTCP15	miR165b	5.0	Clivagem

4. CONCLUSÕES

A partir da análise realizada neste trabalho, foram identificados sete miRNAs que possivelmente estejam regulando a expressão dos genes *FaTCP* em *F. ananassa*. Diversos deles relacionados com processos biológicos importantes como metabolismo primário e resposta a estresses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLA, M. et al. Identification of mirnas and their response to cold stress in astragalus membranaceus. **Biomolecules**, v. 9, n. 5, 2019.
- BUDAK, H.; AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, n. 5, p. 523–531, 2015.
- DAI, X.; ZHAO, P. X. PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 155–159, 2011.
- HAN, J. et al. Computational identification of microRNAs in the strawberry (*Fragaria xananassa*) genome sequence and validation of their precise sequences by miR-RACE. **Gene**, v. 536, n. 1, p. 151–162, 2014.
- HIRAKAWA, H. et al. Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of fragaria species. **DNA Research**, v. 21, n. 2, p. 169–181, 2014.
- MACOVEI, A.; TUTEJA, N. MicroRNAs targeting DEAD-box helicases are involved in salinity stress response in rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Plant Biology**, v. 12, 2012.
- MALLORY, A. C.; ELMAYAN, T.; VAUCHERET, H. MicroRNA maturation and action-the expanding roles of ARGONAUTES. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 5, p. 560–566, 2008.
- MILLAR, A. A.; LOHE, A.; WONG, G. Biology and function of miR159 in plants. **Plants**, v. 8, n. 8, 2019.
- OKUMA, N. et al. MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.
- SINGH, N.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, A. Identification and analysis of miRNAs and their targets in ginger using bioinformatics approach. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 570–576, 2016.
- WANG, J.; MEI, J.; REN, G. Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. March, p. 1–12, 2019.
- WANG, Z. et al. Genome wide identification of microRNAs involved in fatty acid and lipid metabolism of *Brassica napus* by small RNA and degradome sequencing. **Gene**, v. 619, p. 61–70, 2017.
- ZHANG, M. et al. Shoot-derived miR2111 controls legume root and nodule development. **Plant Cell and Environment**, v. 44, n. 5, p. 1627–1641, 2021.
- ZHOU, G. K. et al. Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 3, p. 391–404, 2007.
- ZHOU, L. et al. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4157–4168, 2010.