

ANÁLISE DIFERENCIAL DO TRANSCRIPTOMA DE MORANGO SILVESTRE (*Fragaria vesca*) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Botrytis cinerea*

SELENE HENSE LILGE¹; PEDRO LOPES REISSER²; CHRISTIAN DOMINGUES
SANCHEZ³; MÉLANY ANDRADE THIELO⁴; CLAUDIANE DA SILVA MACHADO⁵;
VANESSA GALLI⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – selenelilge04@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – reisser.pedro@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – christian.kun@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – melanythielo@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – claudiane.machado@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* afeta uma grande variedade de frutos durante a pré e pós colheita, sendo um dos fitopatógenos economicamente mais importantes, especialmente do morango, onde causa o mofo cinzento (FELIZIANI & ROMANAZZI 2016). Atualmente, o manejo da doença ainda é baseado no uso de produtos químicos, que além de terem efeito nocivo ao meio ambiente e à saúde humana, favorecem o desenvolvimento de cepas resistentes a fungicidas (SPADA et al., 2024). Nesse sentido, é necessário encontrar estratégias alternativas para proteger as plantações de pragas endêmicas e outras emergências fitossanitárias (ROSA et al., 2022).

Desafios como este podem ser auxiliados por estudos ômicos, através da análise da interação planta-patógeno, tal como em estudos de melhoramento genético, de fisiologia dos estresses bióticos, dentre outros. No entanto, nem sempre a informação genética da planta a ser analisada está disponível ou bem acurada, como no caso do morango cultivado (*Fragaria x ananassa*), sendo comum a utilização do seu ancestral, o morango silvestre (*Fragaria vesca*), no qual possui um genoma menor e consolidado (VONDRACEK et al., 2024). Embora alguns aspectos relacionados à resistência ontogênica dos frutos de morango tenham sido explorados, existem vários mecanismos transcricionais que permanecem desconhecidos.

O perfil do transcriptoma pode ser utilizado para investigar as interações planta-patógeno, destacando os transcritos regulados durante o processo de infecção (HAILE et al., 2019). Um grande número de genes é expresso diferencialmente sob condições de estresse biótico, e a identificação desses genes responsivos se torna fundamental para o desenvolvimento de linhagens resistentes à infecção e para a definição de estratégias de controle (ALMEIDA et al., 2016). XIONG et al. relataram que mais de 1500 genes relacionados à defesa são induzidos após a inoculação de *B. cinerea* em morangos vermelhos maduros. Nesse contexto, realizamos uma análise diferencial dos transcritos de frutos de morangos silvestres (*Fragaria vesca*) inoculados e não-inoculados com *B. cinerea*, visando elucidar quais os genes responsáveis pela resposta ao ataque do fungo.

2. METODOLOGIA

As leituras *paired-end* utilizadas foram baixadas no SRA/NCBI, sob bioproject 530684, descrito no artigo de HAILE et al. (2019). Enquanto o genoma referência foi

adquirido da plataforma Rosaceae (<https://www.rosaceae.org/>), na versão “*Fragaria vesca* ‘Hawaii 4’ NAU Whole Genome v1.0 Assembly & Annotation”, relatado por ZHOU et. al (2023).

Inicialmente, realizamos o controle de qualidade das leituras utilizando os parâmetros *default* da ferramenta FastP (<https://github.com/OpenGene/fastp>), a qual aponta a qualidade e executa a remoção das leituras de baixa confiabilidade. Utilizando os parâmetros *default* da ferramenta HISAT2 (<https://github.com/DaehwanKimLab/hisat2>), as leituras foram mapeadas e os genes identificados de acordo com os representados no genoma referência. O arquivo gerado foi submetido ao FeatureCounts (<https://github.com/ShiLab-Bioinformatics/subread>) para a contagem dos genes mapeados. Utilizando a ferramenta DESeq2 (<https://github.com/thelovelab/DESeq2>) nos parâmetros *default*, foi realizada a análise diferencial dos genes expressos nas amostras de frutos vermelhos controle e frutos vermelhos infectados. Obteve-se os genes diferencialmente expressos, os quais foram filtrados com o p-value ajustado significativamente ($p_{adj} < 0.05$). Dessa forma, foram identificados os genes mais expressos e menos expressos, cuja anotação foi determinada através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as 1170 sequências analisadas, 292 se apresentaram *upregulated* e 878 *downregulated*, sendo possível observar na Figura 1 que a maioria dos genes regulados foram *downregulated*. Dentre essas, selecionamos as 5 principais *upregulated* e as 5 principais *downregulated*.

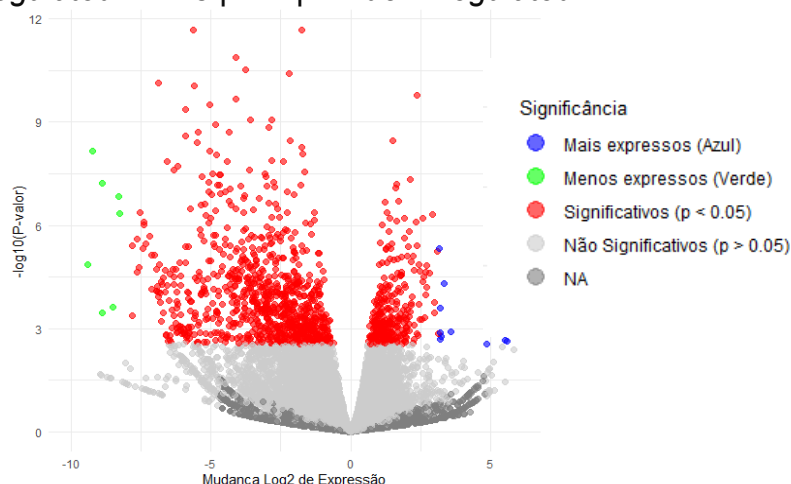


Figura 1. Gráfico Volcano Plot da expressão gênica diferencial

Entre os 5 mais expressos, foi encontrado o gene “Fv putative bifunctional UDP-N-acetylglucosamine transferase and deubiquitinase” que está relacionado ao progresso de glicosilação no retículo endoplasmático (GAO et al., 2008). O gene codificante para a “Rosa chinensis WPP domain-interacting tail-anchored protein 1” está associado à regulação de processos nucleares e ao transporte de proteínas nucleares (MEIER et al., 2010). O gene para a “Fv U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein” está relacionado ao sistema de splicing U12, o qual remove introns do tipo U12, pertencentes aos genes de defesa e resposta ao estresse em plantas (MCNALLY et al., 2006). Já o gene codificante da “Rosa rugosa glutamate receptor 3.6-like” pode estar envolvido na percepção de sinais externos, como a

presença de estresses ambientais e traduzir isso em respostas celulares internas que ajudam a planta a se adaptar (FORDE et al., 2014). E o gene codificante para “Fv BAG family molecular chaperone regulator 6” parece atuar em resposta a infecções; a BAG6 pode ajudar a regular o sistema de defesa da planta, assegurando que as proteínas de defesa sejam corretamente dobradas e funcionais (KABBAGE et al., 2016).

No grupo de genes menos expressos, foi identificado o “Fv laccase-17-like” que codifica para oxidases de atividades catalíticas envolvendo reações de degradação (KADUNGA et al., 2017). O gene “Fv GDSL esterase/lipase At5g33370-like” tem relevância no metabolismo lipídico especializado, nas respostas a estresses abióticos e na regulação da homeostase da planta (ALMEIDA et al., 2024). O gene “Fv transcription factor MYB39” parece ser menos expresso em frutos imaturos, concomitantemente com uma redução no acúmulo de antocianina no fenótipo do pigmento amarelo (ZHANG et al., 2015). O gene “Fv extradiol ring-cleavage dioxygenase-like” parece estar envolvido na produção de antocianinas, isso sugere que essa proteína desempenha um papel no metabolismo secundário, especificamente na síntese de compostos fenólicos (KASEI et al., 2015). E o gene “Fv polygalacturonase At1g48100” que codifica para um tipo de enzima da família das hidrolases que catalisam componentes da pectina e lamela média (PANIAGUA et al., 2022).

4. CONCLUSÕES

Concluimos que a maioria dos genes com expressão diferencial entre frutos de morango infectados e não infectados com *B. cinerea* foram regulados negativamente (*downregulated*). Além disso, foram selecionados os genes mais *up* e *downregulated*. A partir dessas informações, é possível superexpressar genes relacionados à defesa da planta, ou silenciar genes que favorecem o processo de infecção pelo patógeno. Entretanto, ainda se faz necessário mais estudos de validação biológica dos respectivos genes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C. P. de, Barbosa, R. R., Ferraz, C. G., de Castro, R. D., & Ribeiro, P. R. (2024). Genome-wide identification of the GDSL-type esterase/lipase protein (GELP) gene family in *Ricinus communis* and its transcriptional regulation during germination and seedling establishment under different abiotic stresses. ***Plant Physiology and Biochemistry***, 214, 108939.
- Almeida Barros, B. de, Carneiro, A. A., & Alessandra, P. (2016). Identificação por RNAseq e validação por qPCR de genes diferencialmente expressos em sorgo em resposta ao estresse hídrico. XXXI **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**.
- Forde, B. G., & Roberts, M. R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? ***F1000 prime Reports***, 6.
- Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47-63.
- Gao, X. D., Moriyama, S., Miura, N., Dean, N., & Nishimura, S. I. (2008). Interaction between the C termini of Alg13 and Alg14 mediates formation of the active UDP-N-acetylglucosamine transferase complex. ***Journal of Biological Chemistry***, 283(47), 32534-32541.

Haile, Z. M., Nagpala-De Guzman, E. G., Moretto, M., Sonogo, P., Engelen, K., Zoli, L., Moser, C., & Baraldi, E. (2019). Transcriptome profiles of strawberry (*Fragaria vesca*) fruit interacting with *Botrytis cinerea* at different ripening stages. **Frontiers in Plant Science**, 10, 1131.

Kabbage, M., Kessens, R., & Dickman, M. B. (2016). A plant Bcl-2-associated athanogene is proteolytically activated to confer fungal resistance. *Microbial Cell*, 3(5), 224.

Kasei, A., Watanabe, H., Ishiduka, N., Noda, K., Murata, M., & Sakuta, M. (2021). Comparative analysis of the extradiol ring-cleavage dioxygenase LigB from *Arabidopsis* and 3,4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase from betalain-producing plants. **Plant and Cell Physiology**, 62(4), 732-740.

Kudanga, T., Nemadziva, B., & Le Roes-Hill, M. (2017). Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101, 13-33.

McNally, L. M., Yee, L., & McNally, M. T. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H is required for optimal U11 small nuclear ribonucleoprotein binding to a retroviral RNA-processing control element: implications for U12-dependent RNA splicing. **Journal of Biological Chemistry**, 281(5), 2478-2488.

Meier, I., Zhou, X., Brkljacic, J., Rose, A., Zhao, Q., & Xu, X. M. (2010). Targeting proteins to the plant nuclear envelope. **Biochemical Society Transactions**, 38(3), 733-740.

Paniagua, C., Ric-Varas, P., García-Gago, J. A., López-Casado, G., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., ... & Mercado, J. A. (2020). Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. **Journal of Experimental Botany**, 71(22), 7103-7117.

Rosa, S., Pesaresi, P., Mizzotti, C., Bulone, V., Mezzetti, B., Baraldi, E., & Masiero, S. (2022). Game-changing alternatives to conventional fungicides: Small RNAs and short peptides. **Trends in Biotechnology**, 40(3), 320-337.

Spada, M., Pugliesi, C., Fambrini, M., & Pecchia, S. (2024). Challenges and opportunities arising from host-*Botrytis cinerea* interactions to outline novel and sustainable control strategies: The key role of RNA interference. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(12), 6798.

Vondracek, K., Altpeter, F., Liu, T., & Lee, S. (2024). Advances in genomics and genome editing for improving strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Frontiers in Genetics**, 15, 1382445.

Xiong, J. S., Zhu, H. Y., Bai, Y. B., Liu, H., & Cheng, Z. M. (2018). RNA sequencing-based transcriptome analysis of mature strawberry fruit infected by necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 104, 77-85.

Zhang, Y., Li, W., Dou, Y., Zhang, J., Jiang, G., Miao, L., ... & Zhang, Z. (2015). Transcript quantification by RNA-Seq reveals differentially expressed genes in the red and yellow fruits of *Fragaria vesca*. **PLoS One**, 10(12), e0144356.

Zhou, Y., Xiong, J., Shu, Z., Dong, C., Gu, T., Sun, P., & Cheng, Z. M. (2023). The telomere-to-telomere genome of *Fragaria vesca* reveals the genomic evolution of *Fragaria* and the origin of cultivated octoploid strawberry. **Horticulture Research**, 10(4), uhad027.