EXPRESSÃO IN SILICO DE GENES WRKY EM MORANGO (*FRAGARIA X ANANASSA)*

MARIANA PINTO DA MOTA GOMES[1]; AUDREY CHRISTINA NASCIMENTO[2]; VANESSA GALLI[3]

[1]Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPel) – gomesmmariana@gmail,com
[2] Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPel) – audreycn97@gmaill.com
[3] Grupo de pesquisa em genômica vegetal – Biotecnologia – CDTec (UFPel) – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do morangueiro (*Fragaria* × *ananassa*) mostra-se presente e progressiva em diversas regiões; especialmente, devido ao seu sabor, aroma e seus conhecidos potenciais benefícios à saúde, proporcionados pela presença de compostos funcionais (SCHAART et al., 2013; GIAMPIERI et al., 2012). Apesar da grande produção e dos avanços tecnológicos desta cultura, alguns fatores permanecem limitando a sua produtividade e devido a isso, estima-se que o Brasil, ainda, ocupa a nona posição em termos de volume (EMBRAPA, 2023).

Um destes fatores é o estresse causado pela seca e/ou pelo sal (estresses osmóticos) conhecidos por resultar em redução no rendimento da colheita. Além disso, outros fatores limitantes são os estresses bióticos, sobretudo os causados pela incidência de fungos, tornando esta cultura altamente dependente de defensivos agrícolas. Nesse sentido, a resposta ao estresse e ao processo de amadurecimento em frutos de morango envolvem reconstrução metabólica, remodelação celular e reprogramação da expressão gênica (WEI et al., 2016).

Dentre as proteínas envolvidas na regulação gênica, os fatores de transcrição (FTs) 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 (ZHANG e WANG, 2005).A maioria dos FTs vegetais, como WRKY, MYB, NAC, bZIP, bHLH e AP2/DREB, pertencem a uma grande família de genes. Uma das maiores e mais importantes famílias de FTs em plantas é a WRKY (EUGELM et al., 2007) A partir disso, CHEN & LIU (2019) identificaram anteriormente um total de 47 membros da família WRKY em *Fragaria x ananassa.* Dados anteriores do grupo (DO NASCIMENTO, 2019), utilizaram transcriptoma *in house,* de forma a identificar 64 *FaWRKYs* putativas das quais foram caracterizadas quanto à relação filogenética, estrutura gênica, bem como análises de sintenia e elementos cis. Neste estudo, objetivou-se realizar o perfil de expressão gênica *in silico* dessas *FaWRKYs,* em resposta a estresses por déficit hídrico e salinidade.

2. METODOLOGIA

A expressão *in silico* foi realizada com três mRNA-Seq obtidos de frutos maduros de morango: controle/irrigação normal (C), correspondendo a 100% da evapotranspiração da cultura (ETc); estresse hídrico (DS), correspondendo a 85%

da ETc da cultura; o estresse salino (SS), com NaCl 80 mM. Esses bancos estão depositados no GEO (*Gene Expression Omnibus*), sob o número SRA: SRP082122, e a metodologia utilizada para sua obtenção está descrita detalhadamente em GALLI et al., 2016.

Para a análise de expressão gênica, o *software Bowtie* (versão 0.12.7) (LANGMEAD et al., 2009) foi usado para mapear as leituras de cada um dos três bancos nas sequências *FaWRKY* previstas. Posteriormente, as leituras foram contabilizadas por meio da ferramenta SAMtools (versão 0.1.16). O método de normalização de escalas proposto por Robinson e Oshlack (2010) foi utilizado a fim de normalizar os dados. O resultado foi apresentado por meio de um *heatmap*, construído com a ferramenta MeV (mev.tm4.org)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A salinidade provoca diversos tipos de estresse na planta, incluindo a absorção de nutrientes alterada, especialmente de íons como K e Ca, acúmulo de íons tóxicos, sobretudo Na, estresse osmótico e estresse oxidativo. Nas células vegetais, as propriedades físicas e químicas das membranas celulares podem ser alteradas pelo estresse salino, uma vez que provoca um conjunto de alterações deletérias, as quais são observadas em plantas cultivadas em condições de salinidade (VERSLUES et al., 2006; ZHU, 2002). A partir disso, infere-se a necessidade de estudar mecanismos de transcrição que estejam envolvidos em resposta a estes tipos de estresse, visando o desenvolvimento de plantas mais resistentes.

Os resultados mostram que a expressão de 50 *FaWRKYs* foi alterada em função dos tratamentos (Figura 1). Além disso, 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.

A partir disso, cabe ressaltar que esta família de genes já foi bem caracterizada na literatura, em diversas espécies vegetais – dentre as quais estão eucaliptos, tabaco e morango – sob diferentes condições de estresses ambientais, como baixas temperaturas, alta salinidade e déficit hídrico (WANG et al., 2015; WEI et al., 2016; FAN et al., 2018; SONG, JING, YU, 2010). Dessa maneira, faz-se necessária uma investigação mais ampla acerca do papel dos genes WRKY, na resposta a estresses, desde a percepção do estresse pelas células vegetais, as vias de sinalização ativadas, até a indução desses genes, bem como sua ação como fatores de transcrição nos promotores alvo.

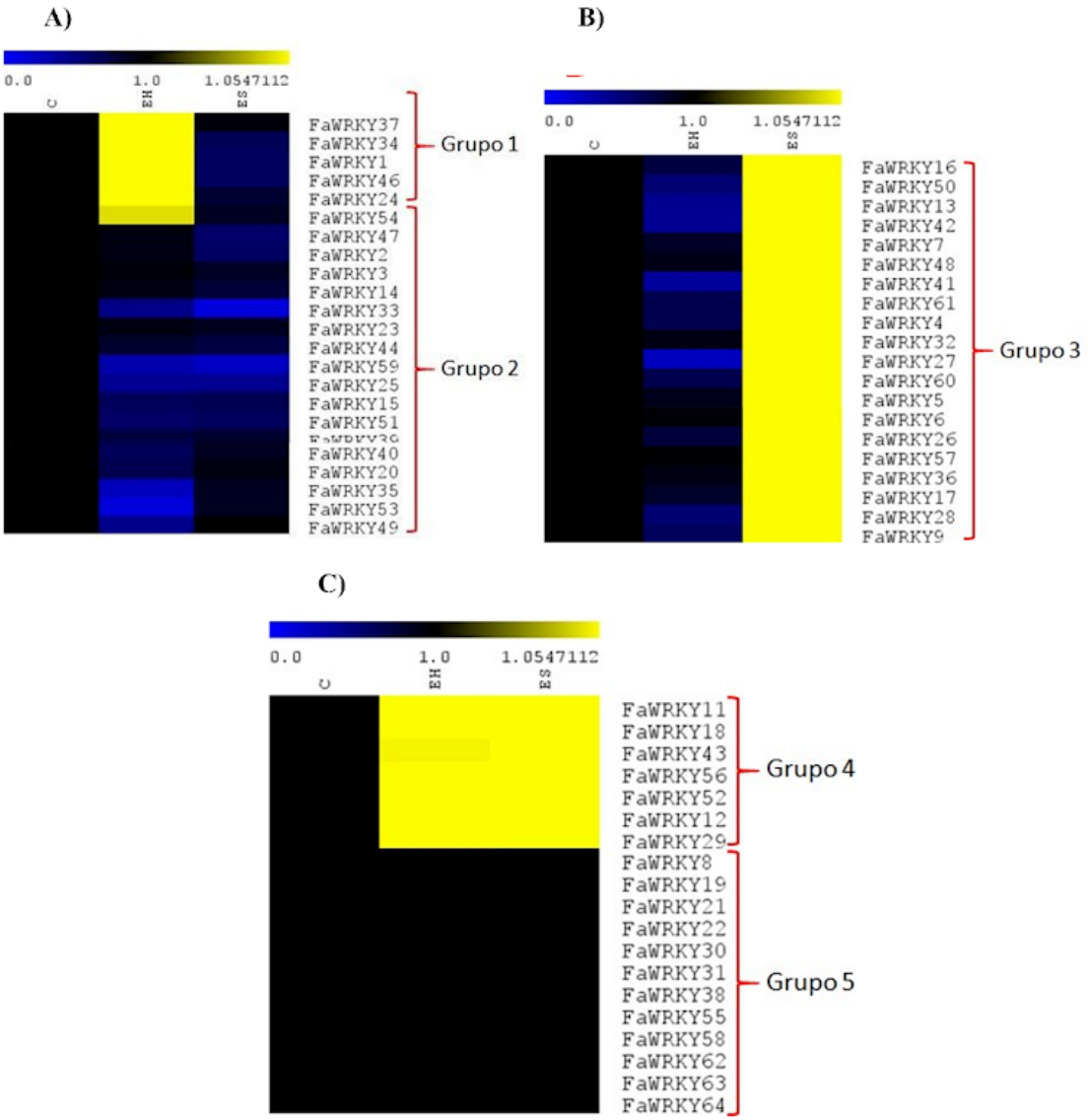

Figura 1. *Heatmap* mostrando uma expressão de fatores de transcrição do tipo WRKY em frutos patenteados a condições de estresse osmótico. Sendo C - controle, EH - estresse hídrico e ES – estresse salino

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. 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

CHEN, L.; YANG, Y.; LIU, C., et al. Characterization of WRKY transcription factors in Solanum lycopersicum reveals collinearity and their expression patterns under

cold treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,v. 464, n. 3, p. 962–968. 2015.

DO NASCIMENTO, A. C. **Identificação e caracterização da expressão de genes que codificam para fatores de transcrição WRKYs em morango (Fragaria x ananassa Duch.)** 2018. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

EMBRAPA, 2023. Acessado em setembro de 2023. Disponível em https://www.embrapa.br/

EULGEM, T. and SOMSSICH, I.E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Curr. Opin. **Plant Biol**, v. 10, p. 366-371, 2007.

FAN, C. et al. Genome-wide analysis of Eucalyptus grandis WRKY genes family and their expression profiling in response to hormone and abiotic stress treatment. **Gene**: [s.l: s.n.], v. 678, p. 38–48, 2018.

GALLI, V.; MESSIAS, R. S.; GUZMAN, F. et al. Transcriptome analysis of strawberry (Fragaria × ananassa) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum**. 2018.

SONG, Y.; JING, S.; YU, D. Overexpression of the stress-induced OsWRKY08 improves osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **Chinese Science Bulletin**: Beijing, v. 54, n. 24, p. 4671–4678, 2010.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 523-539, 2006.

WANG, X.; ZENG, J.; LI, Y. et al. Expression of a WRKY44, a wheat WRKY gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. Front. **Plant Sci**, v. 6, p. 615. 2015.

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.

ZHOU H, L. Y; ZHANG Q, R. S.; SHEN Y, Q. L., 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, e0154312, 2016.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.