

CLONAGEM *IN SILICO* DE FATORES TRANSCRIÇÃO WRKY EM VETOR DE SILENCIAMENTO

YURE RODRIGUES NUNES¹; HUGO CARLOS BOLZON GONZALEZ²; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO³; AVILA FERREIRA DE SOUSA⁴; VANESSA GALLI⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – ym.agro@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

⁵Nome da Instituição do Orientador – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

WRKYs são a maior família de reguladores de transcrição em plantas terrestres, contendo três domínios principais altamente conservados, caracterizados pelo heptapeptídeo característico 'WRKYGQK' e uma estrutura de dedo de zinco distinta de outros *motifs* (estruturas repetidas) dedo de zinco conhecidos (EULGEM et al., 2000). Elas podem regular o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como sua resposta ao estresse biótico e abiótico (SCHUTTENHOFER et al., 2015). Foi confirmado que os genes dos fatores de transcrição WRKY estão relacionados com a reação das plantas contra o fungo hemibiotrófico *Botrytis cinerea* e são críticos para a resistência a doenças reguladas por hormônios e para as redes de sinalização de defesa (ZHENG et al., 2006; LIU et al., 2014; ADACHI et al., 2016).

A *polymerase chain reaction*: PCR, do inglês para, “reação em cadeia da polimerase” é uma técnica de biologia molecular que permite a síntese e amplificação de insertos (*amplicons*) específicos, obtidos a partir de uma fita nucleotídica molde. Através desta metodologia é possível amplificar milhares de vezes uma sequência de DNA de interesse diretamente de um genoma, plasmídeo ou outra fonte de material genético. O sucesso na amplificação do gene é verificado através de análise eletroforética em gel de agarose. Vetores de clonagem apresentam alto número de cópias por célula e são utilizados para a transformação de bactérias específicas, as quais são empregadas para propagação do gene de interesse e fornecimento de DNA plasmidial. O fragmento de interesse é excisado do material obtido através da digestão com endonucleases de restrição, que reconhecem sequências de nucleotídeos específicas, inseridas no fragmento pelos oligonucleotídeos iniciadores, gerando terminais coesivos ou *stick ends* (MALUF; MUNIZ; OLIVIA; GUIDO, 2014).

O silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) é uma técnica de genômica reversa de alto rendimento que explora um mecanismo de defesa antiviral mediado por RNA conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional para análise de genômica funcional (RATCLIFF et al., 1997; SUNILKUMAR et al., 2006). A técnica envolve a inserção de um fragmento do gene de interesse (com aproximadamente 300 pares de base) em um vetor viral, substituindo genes não essenciais do mesmo ou ainda duplicando a região promotora criando um sítio de clonagem (FU et al., 2005). Sua versatilidade permite inferir a função de genes e caracterizá-los, através de uma expressão transiente.

Para utilização da metodologia VIGS, faz-se necessária a busca por alvos que se pretende silenciar a fim de determinar sua função. Nesse sentido, buscou-se duas sequências WRKYs, uma que regula positivamente para

resistência à infecção de *B. cinerea* em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *AtWRKY33*. E outra que regula negativamente para resistência à infecção de *B. cinerea* em morango-selvagem (*Fragaria vesca*), *FvWRKY25*. Dessa forma, os homólogos destas sequências em *Fragaria x ananassa* (morango comercial) foram identificadas, sendo elas: *FaWRKY45* referente a *AtWRKY33*, e *FaWRKY57* referente a *FvWRKY25*. Assim, este trabalho tem como objetivo a identificação das sequências *FaWRKYs* correspondentes às sequências guia (query) bem como a clonagem em vetor de silenciamento VIGS, TRV-2 das duas sequências homólogas encontradas, *FaWRKY57* e *FaWRKY45*.

2. METODOLOGIA

Com ajuda do software Unipro UGENE UI 48,1 foi realizado o alinhamento das sequências *FaWRKY45* e *FaWRKY57* identificadas por (DO NASCIMENTO, 2018) em *Fragaria x ananassa*, utilizando-se do algoritmo ClustalW. As sequências aminoacídicas putativas identificadas em *Fragaria x ananassa* (*FaWRKY*), juntamente com sequências *WRKY* previamente descritas em *Fragaria vesca* (*FvWRKY*) e *Arabidopsis thaliana* (*AtWRKY*) foram utilizadas para construir uma árvore filogenética. Nas sequências previamente descritas identificadas, foi feito o alinhamento para garantir que os iniciadores a serem desenhados fossem específicos de cada cópia gênica.

Os iniciadores específicos para cada sequência *FaWRKY45* e *FaWRKY57* identificada foram desenhados através do programa Benchling, Inc. - Benchling® de modo que os amplicons tivessem em torno de 250 a 380 pares de base aproximadamente, dado que resultados satisfatórios em VIGS são obtidos com fragmentos amplificados em média nessa porção de tamanho. A temperatura de *melting* (T_m) foi mantida entre 51-55°C e o conteúdo de GC de 30-60%. Buscou-se regiões dos iniciadores onde houvesse um *C/G clamp* na porção terminal 3' das fitas sense e antisense para garantir que essa ligação seja mais forte e posteriormente a DNA-polimerase se ligue a fita efetivamente. A fim de possibilitar a clonagem posterior dos insertos no vetor de transformação viral TRV-2, foram adicionadas às extremidades dos iniciadores as sequências nucleotídicas reconhecidas pelas enzimas de restrição, compatíveis com o sítio de múltipla clonagem: MCS, do inglês "multiple cloning site" presente no vetor TRV2, sendo elas *XbaI* (TCTAGA) e *KpnI* (GGTACC).

Para avaliar a compatibilidade dos iniciadores desenhados realizou-se PCR *in silico* com auxílio do software Benchling, Inc. - Benchling® para obtenção dos insertos correspondentes às sequências *FaWRKY45* e *FaWRKY57* e posteriormente realizou-se uma clonagem *in silico* destes insertos no vetor TRV2, avaliando a capacidade dos insertos produzidos de serem corretamente inseridos no MCS do vetor.

Tabela 1. Iniciadores contendo sítio de restrição para amplificação dos respectivos genes de interesse

Nome	Iniciadores	Enzima	Sequência	%CG	Tamanho da sequência	Amplicon
FaWRKY57	F	XbaI	ACTTCACCTTCTC CACTC	50%	18 nt*	

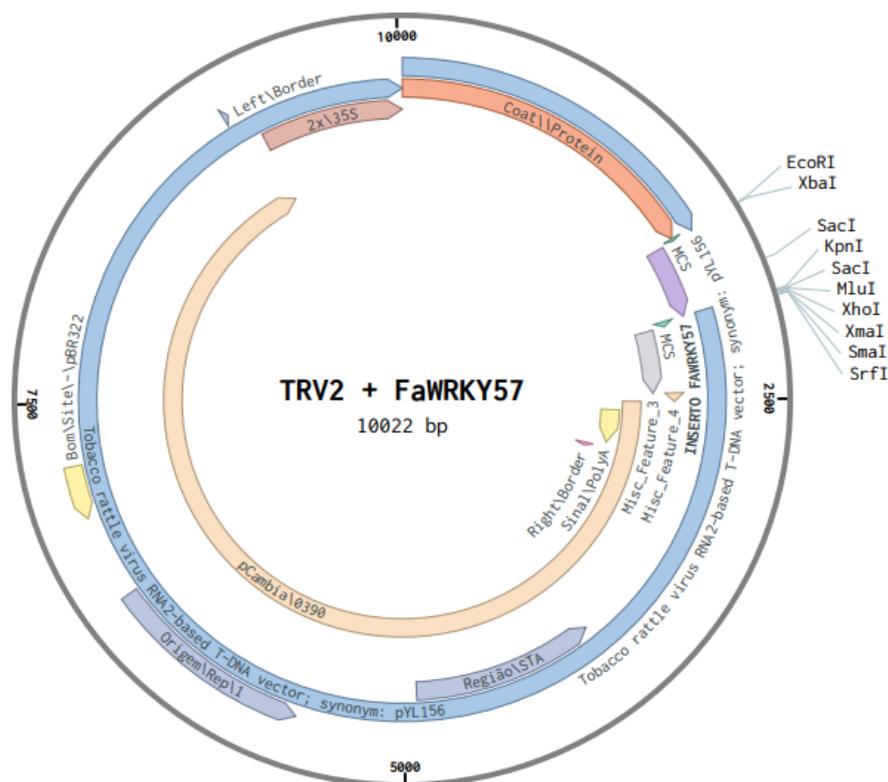
atWRKY45	R	KpnI	GTTGTTGTTATTG TTGTTGTTAG	30%	23 nt*	377 pb**
	F	XbaI	TCCTTCCCCTTCT TCTTAC	38%	21 nt*	
	R	KpnI	ACATTTTCTTCTTC CCTTGAG	47%	19 nt*	

*nucleotídeo; **pb = pares de base.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando dos iniciadores descritos acima, foi possível simular *in silico* a extração dos insertos de interesse (PCR), a digestão enzimática e a montagem do vetor TRV2 clonado, através do programa Benchling, Inc. - Benchling®, comprovando a correta construção dos iniciadores com as respectivas enzimas de restrição, compatíveis com o vetor de destino, resultando em uma clonagem bem sucedida. O vetor clonado está representado na Figura 1.

Figura 1. Ilustração representando o vetor TRV2 clonado com o inserto correspondente ao gene *FaWRKY57*.



4. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu realizar a obtenção *in silico* de um vetor de silenciamento com as sequências FaWRKY57 e FaWRKY45 de morango.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI H., ISHIHAMA N., NAKANO T., YOSHIOKA M., YOSHIOKA H. Nicotiana benthamiana A via MAPK-WRKY confere resistência a um patógeno necrotrófico Botrytis cinerea. **Comportamento do sinal da planta**. 2016; 11: e1183085.

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.

EULGEM, T.R.P.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. A WRKY superfamily of plant transcription factors. **Tendências Plant Sci**, Köln, Alemanha, v.5, n.5, p. 199-206. 2000.

FU, DA-Qi et al. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. **The Plant Journal**, v. 43, n. 2, p. 299-308, 2005.

LIU B., HONG YB, ZHANG YF, LI XH, HUANG L., ZHANG HJ, LI DY, SONG FM Tomato O fator transcricional WRKY SIDRW1 é necessário para resistência a doenças contra Botrytis cinerea e tolerância ao estresse oxidativo. **Ciência das Plantas**. 2014; 227 :145–156.

MALUF, F.V; MUNIZ, J.R; OLIVIA. G.; GUIDO. R.V.C. Cristalografia de proteínas. In: VERLI. H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular** - Porto Alegre, 2014. Cap.13 p252-282: il.

RATCLIFF, F., HARRISON, BD e BAULCOMBE, DC (1997). Uma semelhança entre defesa viral e silenciamento de genes em plantas. **Ciência** 276, 1558–1560.

SCHUTTENHOFER C., YUAN L. Regulação do metabolismo especializado por fatores de transcrição WRKY. **Plantar. Fisiol**. 2015; 167 :295–306.

SUNILKUMAR, G., CAMPBELL, LM, PUCKHABER, L., STIPANOVIC, RD e RATHORE, KS (2006). Engenharia de semente de algodão para uso na nutrição humana por meio da redução específica do tecido do gossipol tóxico. **Processo. Nacional. Acad. Ciência**. EUA A. 103, 18054–18059.

ZHENG ZY, QAMAR SA, CHEN ZX, MENGISTE T. Arabidopsis O fator de transcrição WRKY33 é necessário para resistência a patógenos fúngicos necrotróficos. **Fisiol Vegetal**. 2006; 48 :592–605.