

ANOTAÇÃO GENÔMICA E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO WRKY EM DIFERENTES TECIDOS DE GOIABEIRA

Vinicius Sartori Fioresi, Miquéias Fernandes, Adésio Ferreira, Marcia Flores da Silva Ferreira

Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Agronomia, Centro de Ciências e Engenharia Agrícolas, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil.
vinicius_fioresi@hotmail.com, contatomiqueiasfernandes@gmail.com, adesioferreira@gmail.com, mfloressf@gmail.com

Resumo

Os fatores de transcrição (TFs) da família WRKY são essenciais na regulação de processos de desenvolvimento e respostas a estresses em plantas. Este trabalho teve como objetivo realizar a anotação e a análise de expressão dos genes *WRKY* em *Psidium guajava*. Utilizando o genoma de duas cultivares, foram identificados e anotados 78 genes *WRKY*. A análise filogenética classificou os genes em três grupos principais e revelou ortólogos com funções conhecidas em outras espécies. A análise de expressão em diferentes tecidos, como raízes, folhas e botões florais, mostrou perfis de expressão distintos, indicando a participação desses genes em funções tecido-específicas. A maioria dos genes (85,90%) apresentou localização preferencial no núcleo. Os resultados geram conhecimento fundamental para o melhoramento genético da cultura

Palavras-chave: *Psidium guajava*; Fatores de transcrição *WRKY*; Análise de Expressão; Filogenia; Estresses abióticos.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Biologia Molecular

Introdução

Os fatores de transcrição (TFs) são centrais para as funções celulares, definindo funções e identidade celular. Essencialmente os TFs têm duas funções: encontrar os elementos de DNA apropriados para se ligar; e recrutar proteínas adicionais para o DNA. Alguns fatores de transcrição atuam acessando e descompactando a cromatina fechada, para que outros fatores de transcrição possam se ligar (Guo et al., 2024; Strader; Weijers; Wagner, 2022). As famílias de TFs MYB/MYC, bHLH, ZFPs, WRKY, NAC e bZIP são descritos como envolvidos a resposta de plantas a estresses. Esses fatores regulam genes em resposta a estresses abióticos e bióticos, maturação de sementes, floração e desenvolvimento (Bhat et al., 2024; De Melo et al., 2022).

Os TFs WRKY são diversificados e versáteis em funções, regulando positivamente processos metabólicos, fisiológicos e de desenvolvimento em plantas, vários estudos demonstraram o papel dos TFs WRKY na tolerância a estresses bióticos e abióticos em plantas (Ali et al., 2018; Jiang et al., 2017). Os TFs WRKY são classificados em três grupos principais (I, II e III) com base no número de domínios WRKY e em características dos motivos de dedo de zinco (Rinerson et al., 2015). Os membros do grupo I contêm dois domínios WRKY juntamente com o motivo de dedo de zinco C₂H₂ no terminal C ou no terminal N. Os membros do grupo II e III têm um domínio WRKY C terminal (Brand et al., 2013). O grupo II apresenta cinco subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId e IIe) com base na divergência evolutiva e nos motivos conservados, os membros do grupo I são os antigos e foram responsáveis pela evolução da família WRKY TFs, enquanto o grupo II (IIa e IIb) evoluiu provavelmente de algas com um único domínio WRKY e são separados da linhagem derivada do grupo I (Rinerson et al., 2015).

Em *Populus euramericana*, a regulação positiva do gene *PeWRKY* foi relacionado à tolerância a salinidade e resistência a insetos por meio de seu efeito na expressão gênica relacionada à transdução de sinal de hormônio vegetal, metabolismo da glutathione e vias de sinalização MAPK (Yu et al., 2021). Em *Arabidopsis* o *TaWRKY75* conferiu tolerância à salinidade e à seca ao integrar a via do ácido jasmônico com outras vias metabólicas potenciais (Ye et al., 2021). Em arroz a superexpressão de *OsWRKY45* aumentou a tolerância à doença e à seca (Qilu; Yu, 2009). Os genes *AtWRKY25* e *AtWRKY33* aumentaram a tolerância à salinidade em *Arabidopsis* (Jiang; Deyholos, 2009) e *VvWRKY11* aumentou a resistência contra estresse osmótico em uvas (Liu et al., 2011).

A goiabeira uma frutífera neotropical de ampla ocorrência no mundo pertencente a uma das maiores famílias botânicas existentes (Myrtaceae) (Arévalo-Marín et al., 2021); sendo cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo os maiores produtores são Índia, China, México, Egito e Brasil, respectivamente (Arévalo-Marín et al., 2021). Estudos visando caracterizar genes de relevância em goiabeira são importantes para o desenvolvimento de materiais genéticos. Neste trabalho objetivou-se realizar a anotação estrutural e a análise das modulações na expressão dos genes *WRKY* em *P. guajava*, em diferentes tecidos e cultivares, visando gerar conhecimentos de genes que atuam em mecanismos de regulação do crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses ambientais.

Metodologia

A anotação dos fatores de transcrição *WRKY* foi realizada utilizando o draft do genoma *Psidium guajava* oriundo de sequências genômicas das cultivares “Cortibel RM” e “Paluma” (GUAVADB - <http://guava.ufes.br/>). Para a anotação, sequências das proteínas pertencentes a família *WRKY* de *Arabidopsis thaliana*, foram usadas para realizar busca local usando BLAST (e-value 10^{-25}) no draft de *P. guajava*. A presença dos domínios alvo característicos, nas sequências de *P. guajava* identificadas foi verificada utilizando o banco de dados InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

As sequências de proteínas anotadas para a família, *WRKY*, foram alinhadas no programa MAFFT v. 7.4 (Kato et al., 2002), juntamente com sequências de *A. thaliana*, *Eucalyptus grandis* e *Vitis vinifera*, com os parâmetros blossom 62 e thread 20. O alinhamento de sequências, foi utilizado para construir uma árvore filogenética com o método de máxima verossimilhança (ML) no programa IQ-TREE com 1000 bootstrap (Nguyen et al., 2015) para cada família de TF, posteriormente foram editadas usando o programa iTol.

Para as análises de expressão dos genes da família *WRKY* dados transcriptômicos foram obtidos a partir do sequenciamento de duas cultivares (Paluma e Cortibel RM) acesso PRJNA1020439. Amostras de cinco tecidos (botões florais, folhas imaturas, jovens e maduras, raízes) foram coletados e agrupados para obter pools em Cortibel RM. Para Paluma, foram utilizados quatro tecidos (folhas imaturas, jovens e maduras, raízes). (Canal et al., 2024).

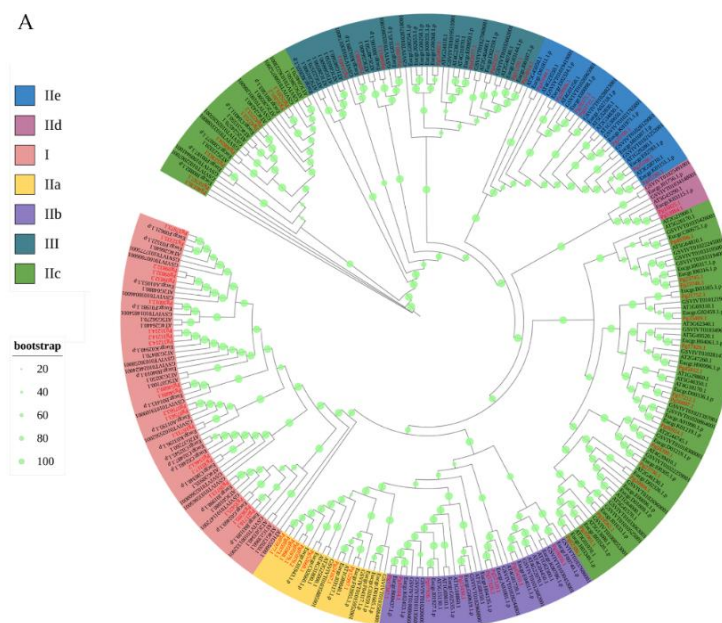
Para as análises de expressão genica foram usados dados obtidos após a etapa de alinhamento das bibliotecas de *reads* filtrados. Foram obtidos os valores de *reads counts*, que representam o número de *reads* que mapearam em um gene. Essa metodologia baseia-se na distribuição binomial negativa, aplicada para calcular a variação da expressão de um transcrito entre diferentes amostras. utilizando os dados de contagem de reads utilizando uma normalização Z. Tais análises foram realizadas com uso do pacote `pacote::função DESeq2::deseq()` (Love; Huber; Anders, 2014) em linguagem R (R Core Team, 2018, version 3.5.1) Foi gerado um heatmap e agrupamentos hierárquico Ward-MLM (Modified Location Model) e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) entre os perfis de expressão diferencial usando `pacote::função heatmaply::heatmaply()`.

Resultados

Foram anotados 78 TFs da família a *WRKY*. Na árvore filogenética construída dos genes *WRKY* de *P. guajava*, os ortólogos de *A. thaliana*, *E. grandis* e *V. vinifera* (Figura 1), auxiliou na classificação dos grupos de genes da família, usando como referência a classificação de *A. thaliana*. As 78 proteínas *WRKY* de goiabeira foram categorizadas em três grupos (grupos I, II e III), e o grupo II foi dividido em cinco subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId e IIe) (Figura 1). O grupo que apresentou maior quantidade de representantes foi IIc com 30,77% (24 genes) e o com menor foi o grupo IId com 2,65% (2 genes)

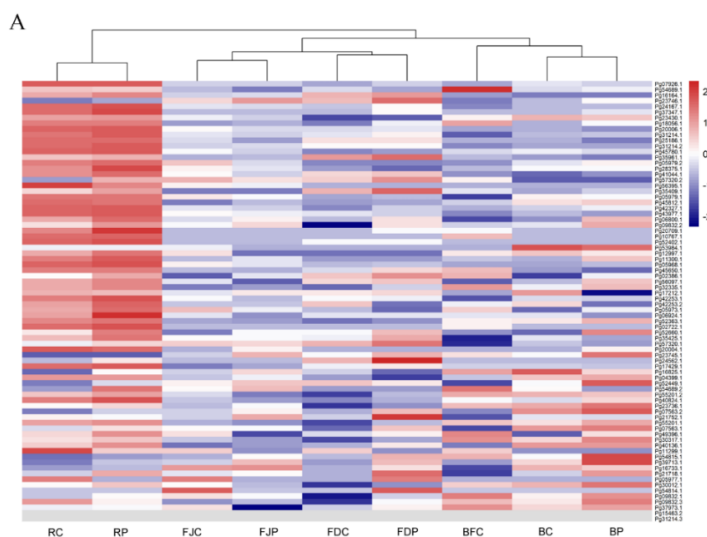
A análise da expressão dos 78 genes *WRKY*, distribuídos em sete subfamílias, foi realizada em cinco tecidos das cultivares Paluma e Cortibel RM (Figura 2). Os genes *WRKY* que apresentaram os maiores níveis de expressão foram *Pg09832.1* e *Pg54689.1*, especialmente no botão floral. Nos tecidos de raiz de ambas as cultivares, destacaram-se os genes *Pg11300.1*, *Pg42327.1*, *Pg31214.1* e *Pg24167.1*. Já nos tecidos foliares, como broto, folha jovem e folha desenvolvida, os genes *Pg30317.1*, *Pg30012.1*, *Pg16733* e *Pg37973* exibiram níveis expressivos de expressão.

Figura 1. Filogenia dos genes de WRKY de *Psidium guajava*. Árvore filogenética reconstruída pelo método de máxima verossimilhança (ML). (A) Genes WRKY (marcados em vermelho), *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus grandis* e *Vitis vinifera*. Todos os WRKY foram agrupados em 7 clados, marcados com cores diferentes.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Figura 2: Análise transcriptômica dos genes WRKY. Abundância relativa nos tecidos de folha jovem, folha desenvolvida, raiz, broto e botão floral das duas cultivares, utilizando dados provenientes de 18 bibliotecas de duas cultivares (Paluma e Cortibel RM) e agrupamento individual e hierárquico. Cada amostra é resultado da média entre as duplicatas biológicas. (A) Genes pertencentes a família WRKY



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

As famílias de genes WRKY e NAC foram caracterizadas estruturalmente, filogeneticamente e por análises de expressão. Estas famílias de TFs possuem membros que regulam processos biológicos, sinalização luminosa, maturação de sementes, desenvolvimento floral, resposta a estresses abióticos e bióticos (De Melo et al., 2022).

O número de genes da família WRKY em *P. guajava* (78 genes) foi similar ao descrito para *E. grandis* (79), *Solanum lycopersicum* (81) (Huang et al., 2012); contudo o número de genes pode variar, em *Glycine max* são descritos 182 genes (Rushton et al., 2010), e em *Carica papaya* apenas 49 (Pan; Jiang, 2014). As comparações das sequências de aminoácidos de *Arabidopsis* e *P. guajava*, revelou dois domínios WRKY localizados nas extremidades C-terminal e N-terminal das sequências no grupo I, e apenas um domínio WRKY nos grupos II e III.

A relação filogenética entre genes pode ser usada para inferir a função dos WRKYs de *P. guajava* ortólogos de genes WRKYs de *A. thaliana*, *E. grandis* e *V. vinifera*. Os pares de genes ortólogos geralmente retêm sua função após a especiação (Blanc; Wolfe, 2004). Sendo uma planta modelo, em *A. thaliana* esforços extensivos foram feitos para caracterizar funcionalmente os genes e a maioria dos WRKYs dessa espécie foi caracterizada funcionalmente (Rushton et al., 2010). Por exemplo, no grupo I, o gene *Pg39713.1* é ortólogo de *AtWRKY58* (*At3g01080*) que regula negativamente a resistência adquirida sistemática em *A. thaliana* (Eulgem, 2006). O ortólogo de *Pg16733* (*AtWRKY44* - *At2g37260*) controla o desenvolvimento de tricomas em *Arabidopsis* (Johnson; Kolevski; Smyth, 2002). *AtWRKY02* (*At5g56270*) ortólogo de *Pg30012.1* está envolvido na regulação da germinação de sementes e no crescimento pós-germinação (Jiang; Yu, 2009). No grupo IIa, o ortólogo de *Pg24167* em *A. thaliana* (*AtWRKY40* (*AT1G80840.1*), aumentou o nível transcricional sob tratamento salino (Zou et al., 2016). Um ortólogo de *Pg35409.1* (*AtWRKY57* - *AT1G69310.1*) eleva o nível de ABA em *Arabidopsis*, o que pode ser útil para aumentar a tolerância à seca e sob estresses abióticos (Huang et al., 2015).

Quanto a análise de expressão o gene *Pg42327.1* que teve alta expressão em raízes, é ortólogos do gene *AtWRKY46* - *AT2G466400.1*, de *A. thaliana*, que está envolvido em estresses abióticos e sinalização hormonal (Ding et al., 2015; Liao et al., 2015; Nuruzzaman et al., 2016). O gene *Pg24167.1* também altamente expresso em raiz, tem ortólogo (*AtWRKY40* - *AT1G80840.1*) *upregulado* sob estresse salino. O gene *Pg16733* que foi altamente expresso em tecidos foliares, é ortólogo de *AtWRKY44* (*At2g37260*) em *A. thaliana*, que controla o desenvolvimento de tricomas, o que pode justificar a expressão em tecidos foliares, principalmente em folhas jovens. Os genes *Pg45812.1*, *Pg35961*, *Pg31214.1* e *Pg45650.1* apresentaram alta expressão em raiz de ambas as cultivares, *Pg45812.1* e *Pg35961.1* são ortólogos de *Eucgr.H00996* - *WRKY23*, *Eucgr.B03520* - *WRKY75*, esses genes de *Eucalyptus*, foram inibidos e tiveram redução da sua expressão, com níveis baixos de nutrientes, enquanto *Eucgr.K02940* - *WRKY33*, *Eucgr.E04011* - *WRKY6* que são ortólogos de *Pg31214.1* e *Pg45650.1* foram ativados com baixos níveis de nutrientes.

Conclusão

Neste estudo, foram identificados e caracterizados 78 genes da família de fatores de transcrição WRKY em *Psidium guajava*. A análise de expressão em diferentes tecidos revelou que genes específicos estão ativos em raízes, folhas e botões florais, sugerindo funções especializadas no desenvolvimento da planta. A análise filogenética permitiu inferir o envolvimento desses genes em respostas a estresses e outros processos regulatórios, com base na ortologia com genes já caracterizados em outras espécies vegetais. Estes resultados fornecem um conhecimento fundamental para futuros programas de melhoramento genético da goiabeira.

Referências

ALI, M. A. et al. Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 226, p. 12–21, 2018.

ARÉVALO-MARÍN, E. et al. The Taming of *Psidium guajava*: Natural and Cultural History of a Neotropical Fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

BHAT, B. A. et al. Transcription factors-golden keys to modulate the plant metabolism to develop salinity tolerance. **Plant Stress**, v. 11, p. 100409, 2024.

BLANC, G.; WOLFE, K. H. Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution. **The Plant Cell**, v. 16, n. 7, p. 1679–1691, 2004.

BRAND, L. H. et al. Elucidating the evolutionary conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and in vitro binding assays. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 21, p. 9764–9778, 2013.

CANAL, D. et al. Exploring the versatility of sesquiterpene biosynthesis in guava plants: a comparative genome-wide analysis of two cultivars. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 574, 2024.

DE MELO, B. P. et al. Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. **Plants**, v. 11, n. 9, 2022.

DING, Z. J. et al. Transcription factor WRKY46 modulates the development of Arabidopsis lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. **The Plant Journal**, v. 84, n. 1, p. 56–69, 2015.

EULGEM, T. Dissecting the WRKY Web of Plant Defense Regulators. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 11, p. e126, 2006.

GUO, Z. et al. bZIP Transcription Factors: Structure, Modification, Abiotic Stress Responses and Application in Plant Improvement. **Plants**, v. 13, n. 15, p. 2058, 2024.

HUANG, S. et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, n. 6, p. 495–513, 2012.

HUANG, X. et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in white pear (*Pyrus bretschneideri*) reveals evolution and patterns under drought stress. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1104, 2015.

JIANG, J. et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 59, n. 2, p. 86–101, 2017.

JIANG, W.; YU, D. Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 96, 2009.

JIANG, Y.; DEYHOLOS, M. K. Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 1-2, p. 91–105, 2009.

JOHNSON, C. S.; KOLEVSKI, B.; SMYTH, D. R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. **The Plant Cell**, v. 14, n. 6, p. 1359–1375, 2002.

LIAO, Y.-L. et al. Isolation, Expression, and Promoter Analysis of GbWRKY2: A Novel Transcription Factor Gene from *Ginkgo biloba*. **International Journal of Genomics**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

LIU, H. et al. Ectopic expression of a grapevine transcription factor VvWRKY11 contributes to osmotic stress tolerance in Arabidopsis. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 1, p. 417–427, 2011.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.

NGUYEN, L. T. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

NURUZZAMAN, M. et al. Transcriptomics-based identification of WRKY genes and characterization of a salt and hormone-responsive PgWRKY1 gene in Panax ginseng. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 2, p. 117–131, 2016.

PAN, L.; JIANG, L. Identification and expression of the WRKY transcription factors of Carica papaya in response to abiotic and biotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 3, p. 1215–1225, 2014.

QIU, Y.; YU, D. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 1, p. 35–47, 2009.

RINERSON, C. I. et al. The evolution of WRKY transcription factors. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 66, 2015.

RUSHTON, P. J. et al. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 5, p. 247–258, 2010.

STRADER, L.; WEIJERS, D.; WAGNER, D. Plant transcription factors — being in the right place with the right company. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 65, p. 102136, 2022.

YE, H. et al. Genome-Wide Identification of Wheat WRKY Gene Family Reveals That TaWRKY75-A Is Referred to Drought and Salt Resistances. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

YU, X. et al. Cloning and overexpression of PeWRKY31 from Populus × euramericana enhances salt and biological tolerance in transgenic Nicotiana. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 80, 2021.

ZOU, Z. et al. Gene Structures, Evolution and Transcriptional Profiling of the WRKY Gene Family in Castor Bean (Ricinus communis L.). **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148243, 2016.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brasil), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) — Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Vitória—ES, Brasil) pelo apoio financeiro concedido a este estudo.