

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

LUZIANE BRANDÃO ALVES

**COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DOS NIVEIS DE METILAÇÃO GLOBAL
DA CITOSINA ENTRE GENÓTIPOS DE GOIABEIRAS EM UM CICLO DE
PRODUÇÃO**

ALEGRE – ES

2018

LUZIANE BRANDÃO ALVES

**COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DOS NIVEIS DE METILAÇÃO GLOBAL
DA CITOSINA ENTRE GENÓTIPOS DE GOIABEIRAS EM UM CICLO DE
PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, na área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira.

ALEGRE – ES

2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da Ufes para ser confeccionada pelo autor

B817c Brandão Alves, Luziane, 1993-
Comportamento diferencial dos níveis de metilação global da citosina entre genótipos de goiabeiras em um ciclo de produção / Luziane Brandão Alves. - 2018.
77 f. : il.

Orientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadores: Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos, Adésio Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Goiabeiras. 2. 5-mC. 3. Expressão gênica. 4. Ciclo de produção. I. Flores da Silva Ferreira, Marcia. II. Rocha de Jesus Passos, Ana Beatriz. III. Ferreira, Adésio. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523

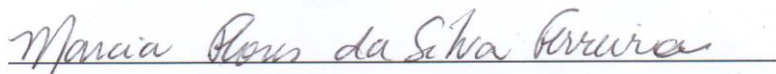
LUZIANE BRANDÃO ALVES

**COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO GLOBAL DA
CITOSINA ENTRE GENÓTIPOS DE GOIABEIRAS EM UM CICLO DE PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 28 de Setembro de 2018.

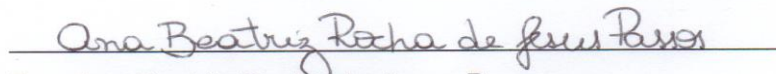
Comissão examinadora



Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora



Dra. Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos

Universidade Federal do Espírito Santo

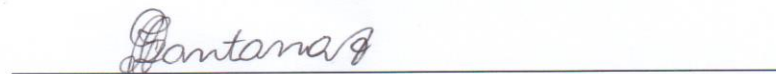
Coorientadora



Dr. Wellington Ronaldo Clarindo

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro interno ao PPGGM



Dra. Fernanda de Abreu Santana Arêdes

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Membro externo a Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico a minha aos meus pais, Pascoal e Jacira, por
todos os seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegado um dos momentos mais importante da minha vida, com um dos grandes sonhos concretizados. De repente passa um filme e começo a lembrar quando vi o meu nome na lista dos aprovados para iniciar o curso de Pós-graduação, em um outro estado, longe de casa, falar para os meus pais, sair de casa pela primeira vez e saber a aprender a lidar com tudo sozinha. Tinha que ser forte. Foi tudo muito rápido e o medo inicial transformou-se em um grande aprendizado e me fez crescer muito. Nesses dois anos só tenho a agradecer por tudo de mais maravilhoso que vivi.

Agradeço imensamente a Deus por estar sempre comigo a todo o momento, me abençoando, me iluminando, me protegendo e me guiando sempre.

Agradeço aos meus pais, Pascoal e Jacira, por toda a dedicação, ensinamentos, por mostrar sempre o quão valoroso é o estudo e por todo o apoio e estarem ao meu lado a todo instante. A minha irmã Gislane por toda a sua contribuição. Juntos, vocês constituem a minha fortaleza.

Agradeço muito a minha orientadora, Professora Marcia Flores da Silva Ferreira pela confiança, aos conhecimentos adquiridos, a compreensão, por acreditar em mim e me proporcionar a trabalhar com um tema que foi inicialmente foi muito novo, mas me fez colher frutos e despertar o gosto de forma significativa pela área. Muito obrigada pelo carinho.

A minha coorientadora Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos que somou de forma significativa para a realização deste estudo, estando sempre aberta a me ajudar e tirar as constantes dúvidas, em especial nos momentos de grande desespero e ansiedade e agradeço também pela amizade construída. O meu muito obrigada.

Ao meu coorientador, Prof. Adésio Ferreira, pela disponibilidade, atenção, ajuda nas análises e a sua contribuição de forma geral nesse trabalho.

Agradeço ao Prof. Wellington e a Doutora Fernanda pela disponibilidade e as importantes contribuições e sugestões na melhoria e desenvolvimento da pesquisa.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES pelo apoio financeiro no trabalho.

A todos os mestres que conheci e ao longo do curso e que contribuíram de forma valiosa para a minha formação e também como pessoa.

A Abigail que me ajudou bastante na minha vinda para Alegre, respondendo os meus inconstantes e-mails, mesmo não nos conhecendo e me apresentando aos seus grandes amigos, em especial Lucimara e Clever, onde pude aprender bastante.

As queridas amigas Aléxia e Luara, pela amizade construída, aos inúmeros momentos de grandes descontrações. Obrigada pela partilha nessa nossa longa caminhada, e não mais importante pela parceria nas aulas de dança.

Aos meus colegas de laboratório Marina, Matheus, Francine, Natália, Cintia, Lidiane, Guilherme, Drielli, Ramon, José Henrique, Luina, Carolina, Paula, Liana, Soninha, Thais pela convivência e frutíferas discussões.

À Quezia e a Patrícia pelas constantes tardes de estudo e partilha mútua de conhecimento.

Aos meus familiares, por me apoiar, compreender as ausências e torcer sempre.

As minhas amigas de república que foram essenciais pra suprir a saudade de casa e me deixar sempre bem à vontade, em especial a Andressa, Ana Clara, Carol, Ryvia, Bárbara, Thais, Bruna e Paloma.

A Guilherme e ao Pedro pelo apoio fundamental e ajuda ao longo das análises estatísticas.

A Séphora, Micheli e Paulo pela disponibilidade durante as atividades realizadas.

A Sabrina por sempre atender tão bem aos alunos da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e sempre disposta a nos ajudar.

Agradeço a todos aqueles que participaram da minha formação em cada cantinho, caronas, ajudas e que vieram sempre a somar.

A todos vocês, **MUITO OBRIGADA!**

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos; Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam. Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida... E que marcam para sempre”.

Cecília Meireles

ALVES, Luziane Brandão Comportamento diferencial dos níveis de metilação global da citosina entre genótipos de goiabeiras em um ciclo de produção. 2018. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo. Orientadora: Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira. Coorientadores: Dra. Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos e Dr. Adésio Ferreira.

RESUMO

A estrutura da cromatina possibilita ao conteúdo gênico ser acessado de acordo com o seu grau de compactação. Modificações na condensação da cromatina podem ser controladas por mecanismos epigenéticos nos organismos eucariotos. A epigenética é compreendida por mudanças na cromatina sem alterar a sequência de bases do material genético, resultando em alterações na expressão gênica, além de apresentar forte influência do ambiente. Existem diferentes mecanismos epigenéticos que estão sendo relatados na literatura dos quais, a metilação do DNA que consiste na adição de um grupo metil no quinto carbono da base citosina, formando a 5-metilcitosina (5-mC) tem apresentado uma notoriedade nos estudos, devido uma quantidade maior de citosinas as regiões promotoras dos genes. O perfil de metilação global da citosina pode revelar influência epigenética em diferentes fases do desenvolvimento ou de genótipos através dos comportamentos apresentados pelos organismos ou de algum fator vivenciado. Neste trabalho estudou – se a goiabeira - *Psidium guajava* L., uma frutífera da família Myrtaceae com importância nutricional, econômica e de ampla adaptação edafoclimática. O desenvolvimento das plantas resultam em alterações nas respostas dos organismos ao longo do ciclo de vida e podem estar associados aos mecanismos epigenéticos. No presente estudo, objetivou-se avaliar o perfil de 5-mC em goiabeiras adultas em diferentes fases do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo durante um ciclo de produção. Adicionalmente foi estudado o comportamento diferencial de genótipos quanto ao perfil global de 5-mC, bem como a variação deste em diferentes órgãos da cultura. Foram quantificados o percentual de 5-mC em 22 genótipos de goiabeiras ao longo de cinco fases de desenvolvimento da cultura via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e posteriormente realizados estudos nos órgãos diferenciais através da análise global do genoma. Na análise quanto as médias gerais após a quantificação não houve diferença significativa no perfil global de 5-mC entre fases do desenvolvimento. No entanto, as fases vegetativas (Pós-poda e Pós-colheita) obtiveram valores mais variados no percentual de 5-mC em comparação com as fases reprodutivas (florescimento, frutificação e colheita) que apresentaram valores mais homogêneos. Entre os genótipos, verificou-se variação quanto a média geral no conteúdo de 5-mC de 16,34% a 26,19%, com destaque para o genótipo Sassaoka que apresentou o maior percentual de 5-mC durante as fases de desenvolvimento, com exceção do período pós-colheita. Foi possível perceber que dez genótipos de goiabeiras obtiveram interação com as fases do desenvolvimento analisadas. Considerando os órgãos vegetais, não foram encontradas diferenças significativas entre eles. A análise do perfil de metilação global, em goiabeiras permitiu compreender detectar alterações epigenéticas na sequência de DNA, em decorrência de diferentes estádios de desenvolvimento, bem como variação dependente do genótipo, evidenciando a importância destes mecanismos no fenótipo de goiabeiras, mais pronunciado na fase vegetativa.

Palavras-chave: Goiabeiras; 5-mC; CLAE; Expressão gênica; Ciclo de produção.

ALVES, Luziane Brandão. Differential response of cytosine global methylation levels among guava genotypes in one production cycle. 2018. Masters dissertation (Master in Genetic and Breeding). Universidade Federal do Espírito Santo. Advisor: Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira. Co-Advisors: Dra. Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos and Dr. Adésio Ferreira.

ABSTRACT

The chromatin structure allows the gene content to be accessed according to its compaction degree. Modifications in chromatin condensation can be controlled by epigenetic mechanisms in eukaryotic organisms. Epigenetics is understood by changes in chromatin without altering the base sequence of the genetic material, resulting in modifications in gene expression, besides has strong environmental influence. There are different epigenetic mechanisms reported for others studies of which, DNA methylation consisting of the methyl group addition in the fifth carbon of the cytosine base, forming 5-methylcytosine (5-mC) has shown a notoriety in studies due to a higher amount of cytosines at the promoter regions of the genes. The overall methylation profile of cytosine may reveal epigenetic influence at different stages of development or of genotypes through the responses presented by organisms or some experienced factor. In this study, the guava - *Psidium guajava* L., a fruit from Myrtaceae family with nutritional, economic importance and of broad edaphoclimatic adaptation was studied. Plant development results in changes in organism responses throughout the life cycle and may be associated with epigenetic mechanisms. In the present study, the objective was to evaluate the 5-mC profile in adult guava trees at different stages of vegetative and reproductive development during a production cycle. Additionally, we studied the differential response of genotypes in relation to the 5-mC global profile, as well as its variation in different organs of the plant. The 5-mC percentage in 22 guava genotypes was quantified during five phases of the culture development by High-Efficiency Liquid Chromatography and later carried out studies in the differential organs through the genome global analysis. In the general averages analysis after quantification, there was no significant difference in the overall 5-mC profile between developmental phases. However, for vegetative stages (Post-pruning and Post-harvesting) was observed values with more variation in the percentage of 5-mC when it was compared with the reproductive phases (flowering, fruiting and harvesting) that presented more homogeneous values. Among the genotypes, was observed a variation of the general mean in the 5-mC content ranging from 16.34% to 26.19%, especially the Sassaoka genotype, which presented the highest percentage of 5-mC during the developmental stages, with the exception of the post-harvest period. It was possible to notice that ten guava genotypes interacted with the development phases analyzed. Considering the plant organs, no significant differences were found between them. The analysis of the global methylation profile in guava allowed to understand and detect epigenetic changes in DNA sequence due to different stages of development, as well as genotype-dependent variation, highlighting the importance of these mechanisms in guava phenotype, more pronounced in the vegetative phase

Keywords: Guava; 5-mC; CLAE; Gene expression; Production cycle.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da ocorrência de metilação em eucariotos. Transferência do grupo químico metil (CH₃) por meio da S-adenosil-metionina, catalisada pela DNA metiltransferase (DNMTs)..... 23
- Figura 2. Fases analisadas sobre o desenvolvimento das goiabeiras. A: Pós-poda, B: Florescimento, C: Frutificação, D: Colheita, E: Pós-colheita..... 38
- Figura 3. Tecidos de goiabeira analisados para o %5-mC. A: Gema apical, B: Folha nova, C: Folha desenvolvida, D: Galho, E: Botão floral..... 39
- Figura 4. Percentual de 5-mC nas fases pós – poda (54 dias após a poda - DAP); florescimento (91 DAP), frutificação (119 DAP), colheita (182 DAP), pós – colheita (302 DAP), ao longo do um ciclo de produção em pomar experimental com 22 genótipos de goiabeiras. As barras denotam o desvio padrão para cada fase. Letras iguais não diferem entre si. 44
- Figura 5. Porcentagem média de 5-mC em 22 genótipos de goiabeiras, considerando as cinco fases estudadas (Pós-poda, florescimento, frutificação, colheita e pós-colheita). As barras apresentam os desvios padrões obtidos em três repetições nas cinco coletas em fases vegetativas e reprodutivas, totalizando 15 dados por genótipo. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância 45
- Figura 6. Análise dos genótipos dentro de cada nível de desenvolvimento da espécie. As análises em boxplots representam o percentual global de 5-metilcitosina dos genótipos em cada fase estudada, com os desvios padrões e seu respectivo teste de médias obtidas por meio de Scott-Knoot a 5% de significância. 47
- Figura 7. Genótipos que apresentaram interação entre as fases de desenvolvimento e o conteúdo de metilcitosina. As médias seguidas pelas mesmas letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível 1% de significância 50
- Figura 8. *Heatmap* demonstrando o percentual de 5-mC para cada genótipo nas cinco fases de desenvolvimento ao longo do ciclo de produção. A escala de cores determina

quanto mais escuro maior a % 5-mC. B: dendograma dos grupos formados de acordo com o percentual de 5-mC considerando os níveis de metilação dispostos nas cinco fases de desenvolvimento de *Psidium guajava* L.....51

Figura 9. Correlação de Pearson com significância testado pelo método de “t” através do resultado de 5-mC com os caracteres morfoagronômicos avaliados. gen: genótipos; met: metilação; NBRA: número de brotos no ramo ao ano; CB: comprimento dos brotos; NBF: número de botão floral; NFA: número de flores abertas; PROD: produção. 53

Figura 10. Dispersão gráfica de 22 genótipos de goiabeira em cada variável agrônômica dentro dos níveis de 5-mC ao longo do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da cultura. 55

Figura 11. Percentual de 5-mC em órgãos vegetativos e reprodutivos determinado por CLAE. FD: folhas desenvolvidas; FD: folha desenvolvida; FN: folha nova; GA: gema apical; G: galho; BF: botão floral; ns: não significativo. Paluma e Século XXI não apresentaram botão floral durante a coleta realizada. 56

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Descrição dos 22 genótipos de goiabeira utilizados no estudo. As variáveis cor da polpa, textura da casca, massa do fruto, massa e rendimento da polpa foram descritas no trabalho de Silva (2017). | 37 |
| Tabela 2. Percentual de 5-mC de 22 genótipos de goiabeiras em cinco fases de desenvolvimento da planta em um ciclo de produção. | 43 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 EPIGENÉTICA: DEFINIÇÃO E ABORDAGEM..... | 19 |
| 2.2. MECANISMOS DE METILAÇÃO DO DNA E CONTROLE GENÉTICO. | 22 |
| 2.3 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA GOIABEIRA..... | 30 |
| 2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ANÁLISE DE 5- mC | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 35 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 4. MATERIAL E METÓDOS | 36 |
| 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAL VEGETAL | 36 |
| 4.2. AVALIAÇÃO DE 5-mC POR CLAE | 39 |
| 4.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO | 39 |
| 4.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE | 40 |
| 4.3 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS | 41 |
| 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 41 |
| 5. RESULTADOS | 43 |
| 5.1 VARIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL NAS FASES DE DESENVOLVIMENTO DE GOIABEIRAS | 43 |
| 5.2 CORRELAÇÃO E DISPERSÃO ENTRE % 5-MC E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS | 52 |
| 5.3 % DE 5-MC EM TECIDOS DIFERENCIAIS DE GOIABEIRA | 56 |
| 6. DISCUSSÃO | 57 |
| 7. CONCLUSÃO | 63 |
| REFERÊNCIAS..... | 64 |
| Apêndices..... | 75 |

1. INTRODUÇÃO

A cromatina é uma estrutura que está envolvida em diferentes sinais celulares e por sua vez, atua como resposta transcricional. Mudanças em sua estrutura podem desencadear efeitos biológicos nos organismos. O DNA e as histonas são componentes básicos da cromatina, e a sua organização ocorre através de domínios, como euromatina e heterocromatina que se diferenciam quanto a conformação, atividade de transcrição e tempo de replicação. A arquitetura da cromatina e as propriedades biológicas são mantidas ao longo das gerações, entretanto, modificações em um dos componentes resulta em pontos moleculares diferenciando entre cromatina ativa ou inativa (LI, 2002).

A plasticidade fenotípica, também relacionada a fatores epigenéticos, induz a adaptação dos organismos às diferentes condições ambientais e as variações fenotípicas são atribuídas à expressão gênica na planta durante o seu desenvolvimento. À medida que a variação epigenética é considerada um componente para a potencialidade do organismo ao ambiente, a diversidade genética e epigenética, bem como as suas relações, podem representar padrões diferentes em muitas espécies e, conseqüentemente, levar a formação de fenótipos distintos (LELE et al., 2018).

A epigenética consiste em alterações na cromatina sem ocasionar alterações na sequência de DNA. A ocorrência de eventos que atuam na regulação gênica associados a modificações no DNA e nas histonas, RNAs não codificantes e remodelação do nucleossomo são mecanismos epigenéticos que constituem moduladores essenciais das plantas em respostas ao ambiente, englobando modificações decorrentes da variação fenotípica de forma hereditária (ALONSO et al., 2018; GALLUSCI et al., 2017; XU et al., 2018).

Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação na base citosina no DNA, caracteriza-se uma das modificações mais estudadas em plantas e animais, ao qual consiste na adição de um grupo metil no quinto carbono da base citosina, formando a 5-metilcitosina (5-mC) (VIDAKI et al., 2013; RICHARDS et al., 2017). Além da 5-mC, também foram relatadas modificações na adenina formando a N6-metiladenina (6-mA) e no quarto carbono da citosina desencadeando a N4-metilcitosina (4-mC), no entanto

essas são exclusivas de alguns grupos de eucariotos como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (RATEL et al., 2006; GREER et al., 2015).

Eventos epigenéticos sensíveis ao meio ambiente podem atuar na transmissão de características em respostas às variações ambientais ao longo das gerações. As epimutações são um tipo dessas variações que influenciam o fenótipo e podem estar, sob seleção natural, contribuindo para a adaptação, de forma independente da variação disposta na sequência de DNA (RICHARDS et al., 2017).

Os estudos sobre o mecanismos epigenético de metilação do DNA são importantes para compreender o desenvolvimento de organismos eucariotos. As discussões quanto às plantas cultivadas estão relacionadas à estresses biótico e abiótico. Como exemplos, tem-se os estudos realizados com esse enfoque, em culturas como milho, soja, arroz e batata (LI et al., 2014; HUANG et al., 2017; GEORGIEVA et al., 2017; WANG et al., 2018; TIWARI et al., 2015).

Entretanto, quando relaciona-se a estudos de desenvolvimento em espécies frutíferas isso ainda é desconhecido. Dessa forma, a frutífera utilizada nessa abordagem, no estudo do mecanismo epigenético da 5-mC foi a goiabeira (*Psidium guajava* L), com destaque na economia brasileira.

O fruto, a goiaba, é consumido tanto *in natura* quanto na indústria para a produção de sucos, doces e derivados. Além de apresentar alto valor nutricional, com alto valor de vitamina C, expressivo percentual de açúcar, vitamina A e B, ferro, fósforo e cálcio. A espécie é nativa do México e da América Central. Seu cultivo ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (SILVA et al., 2014). Os maiores produtores da cultura no mundo são: Cuba, Brasil, México, Sul da China, Índia e Malásia. A cultura se destaca no âmbito econômico com o quarto lugar no Brasil em relação à área e a produção, ficando atrás apenas da manga, banana e citros (PEDAPATI et al., 2014).

Dentre as metodologias utilizadas para detectar a análise de metilação no DNA, a análise global da 5-mC via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) destaca-se pela sua reprodutibilidade e precisão na análise, além de ser considerada um método padrão-ouro para a quantificação e estimativa na metilação global do DNA (ALONSO et al., 2016; LISANTI et al., 2013), além de caracterizar mudanças do fenômeno durante o crescimento e o desenvolvimento do organismo (CHEN et al., 2013).

A quantificação em escala global da metilação do DNA é relevante por determinar em escala maior as diferenciações que metodologias utilizando sequências específicas no genoma não conseguem detectar. Apesar da análise global não diferenciar sequências codificadoras e não codificadoras e não encontrar diferenças sutis entre genes individuais, permite estudos e avaliações em grande escala de respostas a determinadas características das plantas, como estresse e condições de acondicionamento e aclimação (JOHNSTON et al., 2005).

Estudos apontaram variação nos comportamentos de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de genótipos comerciais e germoplasma melhorado de goiabeiras no Brasil, quando cultivados na mesma condição em campo (SILVA, 2017). Embora a influência genética tenha sido mostrada por marcadores moleculares neste germoplasma (COSER et al., 2012), mecanismos epigenéticos associados à variabilidade na cultura ainda são desconhecidos.

Com este trabalho, objetivou-se identificar se mecanismos epigenéticos de 5-mC atua significativamente nas fases de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de um ciclo de produção em goiabeiras adultas em campo, bem como se existe comportamento diferencial dos genótipos quanto ao perfil global de 5-mC. Além disto, buscou-se conferir o perfil de metilação em diferentes órgãos vegetais.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 EPIGENÉTICA: CONCEITO E ABORDAGEM

A manifestação de um evento epigenético resulta em alterar a conformação da cromatina, deixando-a eucromática e possibilitando a ocorrência de transcrição, ou heterocromática, dificultando a ação dos fatores de transcrição para uma determinada região do genoma, propiciando que os genes sejam expressos ou silenciados (COSTA & PACHECO, 2013).

A epigenética caracteriza-se os mecanismos que alteram a expressão gênica, modificando a estrutura da cromatina, sem comprometer a sequência de bases de DNA (POWLEDGE et al., 2009). De forma geral acontece a adição de resíduos químicos nas bases e os epigenomas vegetais tendem a ter maior suscetibilidade quanto a influência ambiental (BAULCOMBE & DEAN, 2014).

Os estudos epigenéticos são caracterizados por influências ambientais e durante o desenvolvimento, visando compreender como o percurso das células é mantido e reprogramado. Além disso, é possível perceber como ocorre a ação do meio ambiente sobre o genoma e como as informações, que não tem associação com as características genéticas, são transmitidas ao longo de gerações (HENIKOFF & GREALLY, 2016).

Os advenços nas pesquisas epigenéticas em vegetais foram provenientes de estudos realizados com *Arabidopsis thaliana*, sendo possível perceber que os epialelos formados como consequência de modificações de genes envolvidos na “maquinaria” da metilação do DNA resultam em diversos caracteres específicos ao decorrer do desenvolvimento do organismo (GOETTEL & MESSING, 2013). Os indivíduos desta espécie apresenta tolerância a reduções significativas nos padrões de metilação do DNA, e esse fenômeno possibilitou a descoberta e compreensão de muitos mecanismos que eram desconhecidos (NIEDERHUTH et al., 2016).

Os mecanismos epigenéticos podem levar a estados de alteração que se mantêm durante as divisões celulares e podem permanecer ao longo das gerações. O estado de silenciamento ocasionado pelos efeitos epigenéticos podem ser passado nas plantas para novas células, tecidos ou órgão vegetal a medida que surgem (BAULCOMBE & DEAN, 2014).

As alterações epigenéticas são mudanças químicas e estruturais na cromatina, resultando em modificações na expressão de genes, que podem se perpetuar ao longo das gerações, associadas à presença de epimarcas na molécula de DNA, sem ocasionar alterações na sua sequência. Caracterizam, assim, a adição de grupamentos químicos, como a metilação e a hidroximetilação no DNA, as modificações nas histonas (metilação, acetilação, ubiquitinação, biotilação) e a ação de RNAs não codificadores (VIDAKI et al., 2013). A identificação e descrição de epialelos possibilita a sua associação, mediante estudos mais avançados, à características de interesse, importantes ao desenvolvimento de plantas.

A ocorrência de mecanismos epigenéticos está associada de várias formas à estrutura do genoma e os estímulos ambientais podem induzir aos mecanismos com consequências genéticas, além disso, o controle epigenético sob os transposons podem também estar relacionados a outros efeitos genéticos (BAULCOMBE & DEAN, 2014).

Os elementos transposons são parte do genoma de organismos eucariotos conhecidos como DNA móvel. Alguns são conhecidos como autônomos, fazem parte da codificação de enzimas e possibilitam passar de uma posição para outra no genoma, ou seja, promover sua própria transposição. Outros são conhecidos como não autônomos que apresentam repetições invertidas terminais, com sequências que atuam apenas em *cis* (HORVATH et al., 2017; WATSON et al., 2015). Esses elementos transposons, de forma geral, se apresentam em grande quantidade no genoma e caracterizam-se por sua grande mobilidade e por seu tamanho variado (HORVATH et al., 2017).

Os mecanismos epigenéticos estão envolvidos em diferentes processos de desenvolvimento da planta e, dessa forma, modelam a plasticidade fenotípica e atuam também como respostas adaptativas às condições ambientais e às instabilidades apresentadas. Com isso, espera-se que as variações epigenéticas possam aumentar a expressão fenotípica do vegetal, visando-a adaptar-se frente às condições do meio sob intensas mudanças, ou também influenciar na etapa de produção e qualidade na colheita (GALLUSCI et al., 2017).

A diversidade fenotípica é decorrente de variações que ocorrem no alelo e isso tem ação sobre os polimorfismos genéticos encontrados nos indivíduos. A variabilidade alélica pode ser ocasionada por diferentes fatores, que podem ser em sequências de pequena escala, como, por exemplo, as mutações de pontos e os

pequenos *indels* ou rearranjos genômicos em escala maior, como a inserção de transposons e a ocorrência de recombinação que envolvem quebras cromossômicas. Entretanto, notou-se uma extensa variabilidade fenotípica que não origina alterações primárias nas sequências nucleotídicas, mas, configura-se como um fator epigenético, resultando na variação da expressão gênica que é observada. (GOETTEL & MESSING, 2013).

A regulação epigenética está associada à relação no âmbito transcricional do genoma que atua para o desenvolvimento dos organismos vegetais, e à ocorrência dos mecanismos de diferenciação celular que são mediados por meio de fatores de transcrição caracterizam-se de suma importância. Muitos desses mecanismos estão atrelados ao controle epigenético, que atua na expressão e regulação de caracteres ao longo do desenvolvimento do organismo. Tais fatores de transcrição têm presentes reguladores que atuam na repressão ou ativação de genes por meio da conformação da cromatina estabelecida (IKEUCHI et al., 2015).

A manifestação de características epigenômicas estão continuamente descritas e relacionadas à regulação gênica ao longo do desenvolvimento dos organismos, nas especificidades dos tecido e supressão de elementos transponíveis, tanto em animais como em vegetais. O epigenoma, ao contrário do mecanismo de atuação do genoma, é constantemente modificado por fatores ambientais que ocorrem nos organismos (KUMAR, 2018).

As variações hereditárias decorrentes da metilação do DNA podem ocasionar certos casos de mutações epigenéticas, como a mutação pontual genética, ou a mudança da citosina para timina, mas, em sua maioria, podem levar a caracteres fenotípicos e eles podem incidir de forma positiva ou negativa sobre as plantas. Essas variações podem se manter estáveis e passarem ao longo das gerações, bem como ser um evento momentâneo, como indício de proteger a planta sob determinada condição do meio (UTHUP et al., 2011).

A ação dos mecanismos epigenéticos associados ao DNA e as histonas estão envolvidos na regulação das interações durante o desenvolvimento das plantas e também funciona como um mecanismo de defesa contra agentes externos e internos para garantir a sobrevivência dos organismos (NGOM et al., 2017; BAROZAI & AZIZ, 2018).

A regulação epigenética pode resultar em alterações na expressão dos genes ou no fenótipo celular que são transmitidos através dos processos de divisões

celulares por meio da mitose e/ou meiose. A herança epigenética transcorrida às próximas gerações pode ser fonte de estudo da variação quantitativa entre diferentes espécies e variedades de plantas, com relevância aos programas de melhoramento genético vegetal. Como exemplo, pode-se citar as variações decorrentes do frio para a ocorrência de florescimento em determinadas espécies de *Arabidopsis*, as quais são associadas à ocorrência da epigenética no *locus* do gene *FLC* (GALLUSCI et al., 2017).

As pesquisas tem demonstrado como a regulação epigenética está envolvida com a regulação transcricional genética, constituindo um auxílio no desenvolvimento da planta. A diferenciação celular ocorre através da ação de reguladores de transcrição que em sua maioria estão sob controle epigenético para regular temporalmente sua expressão ao longo do desenvolvimento. Alguns dos fatores de transcrição também recrutam ou inserem reguladores epigenéticos para a ativação ou inativação de genes alvo de acordo com as modificações no *locus* da cromatina. Estes mecanismos que ligam as duas regulações servem como uma proteção no controle gênico específico do estágio de desenvolvimento, destacando a plasticidade apresentada pelas células vegetais (IKEUCHI et al., 2015).

Os estudos no âmbito da epigenômica vêm crescendo a cada dia e isto está associado às novas marcas epigenéticas que estão sendo evidenciadas nos diferentes organismos. Associado a isso, duas novas marcas foram identificadas, 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) e a N6-metiladenina (6-mA) (KUMAR, 2018).

Assim, as constantes mudanças na célula, desencadeadas por mecanismos genéticos e ambientais, resultam em alterações que recaem como parte da memória celular após cada etapa de divisão que a célula passa. O conceito e o papel da epigenética passou por diferentes remodelações, mas, atualmente, relaciona-se às mudanças, tanto mitóticas quanto hereditárias, na expressão dos genes, sem ocasionar danos à molécula de DNA. Os seus estudos tratam-se de alterações químicas interferindo no DNA, nas histonas e no silenciamento transcricional (IWASAKI & PASZKOWSKI, 2014).

2.2 MECANISMOS DE METILAÇÃO DO DNA E CONTROLE GENÉTICO

CHG (ZHU et al., 2016). Entretanto para a ocorrência da metilação *de novo*, nos contextos CHH, elas têm ação por meio dos domínios rearranjados de DNA (DRM2) que catalisam esse tipo de metilação (MATZKE & MOSHER, 2014).

Em *Arabidopsis thaliana*, a manutenção da metilação ocorre de três formas, considerando o contexto no qual está inserida e a configuração da sequência. No contexto CG, a metilação é mantida por meio da enzima MET1, considerada um homólogo de DNA metiltransferase 1 em mamíferos. No contexto CHG e na maioria do CHH na heterocromatina, isso acontece por meio de duas enzimas específicas, a CMT3 e a CMT2, agindo juntamente com algumas histonas e seus homólogos; e nos demais sítios de CHH, a manutenção é realizada por meio da via DMR, em especial na eucromatina (SONG & CAO, 2017).

Para os trechos CHH, considerada uma metilação não simétrica, a metilação é mantida por meio de uma via de metilação controlada por RNA (RdDM), com pequenos siRNAs que agem como guias para os domínios rearranjados de metiltransferase 2 (DRM2) (BROCKLEHURST et al., 2018).

Os genes da família da MET1 são as principais metiltransferases de DNA de manutenção nos locais CpG e demonstram ser uma parte importante dos mecanismos que determinam as transições nas fases de desenvolvimento no ciclo de vida das plantas, além dessas, as CTM ou cromometilases que além de pertencer apenas ao universo vegetal, contêm uma homologia ao domínio BAH, que é uma característica comum também às metiltransferases DNMT1/MET1 (ASHAPKIN et al., 2011).

Nas plantas, a manifestação da metilação *de novo* ocorre quando as bases de citosinas, até então não metiladas, após a transcrição, resultam em novos padrões de metilação (DHAR et al., 2014). Esse tipo é coordenado por meio de pequenos RNAs interferentes, os siRNAs, e pode acontecer em um dos três contextos de metilação no genoma (PIKAARD & SCHEID, 2014).

Por outro lado, a metilação de manutenção ocorre em trechos do DNA metilados preexistentes, em especial nos contextos CG e CHG, ditos locais simétricos, pois a leitura ocorre no sentido 5' – 3' da fita e essa simetria possibilita um padrão de metilação passado às células filhas, decorrente da etapa de replicação da molécula de DNA (PIKAARD & SCHEID, 2014).

Nos contextos CG, a metilação do DNA pode ser herdada em virtudes das DNA metiltransferases 1 (DNMT1) que realizam a manutenção dessa marca epigenética, fazendo com que os contextos hemimetilados meCG/GC se transformem em

dinucleotídeos meCG/GCme simetricamente metilados logo após o processo de replicação do DNA (HENIKOFF & GREALLY, 2016).

Nos contextos assimétricos de ocorrência da metilação do DNA, isso ocorre após o processo de replicação da molécula e apenas as células novas ou filhas passam a apresentar o grupamento metil via DRM2 (os domínios rearranjados de metiltransferases 2) que tem ação sobre sequências específicas por meio de siRNA, seguindo a via de metilação por meio do RNA (RdDM) (GALLUSCI et al., 2017).

Variedades de plantas que apresentam níveis reduzidos de metilação tendem a crescer, se desenvolver e serem capazes de competir com demais variedades por recursos disponíveis em um determinado ambiente. Isso pode ser refletido em variedades de híbridos que são tolerantes a densidade e que por sua vez apresentam um nível menor de metilação em relação à aquelas que são sensíveis a densidade. Considerando plantios realizados em alta densidade, as plantas que são tolerantes apresentam expressão gênica e características metabólicas maiores, proporcionando um maior rendimento, conseqüentemente (YAISH, 2013).

Nos vegetais, a S-adenosilmetionina (SAM) caracteriza-se como receptor para ofertar a 5-metilcitosina durante a catalisação da metiltransferase. Ela ocorre em diferentes componentes que fazem parte da estrutura do gene, e realiza diferentes funções que atuarão na regulação gênica. Esta regulação ocorre através dos mecanismos da metilação e desmetilação, considerando o tempo e o espaço ao decorrer do desenvolvimento (DOU et al., 2017). Essas enzimas apresentam motivos conservados homólogos na estrutura que irão determinar as atividades enzimáticas específicas, e para a maioria das proteínas, as DNA metiltransferases que atuam sob a citosina, contém cerca de 10 regiões conservadas dispostas em sequências definidas (BURYANOV & SHEVCHUK, 2005).

Diminuir a quantidade de metilação global do DNA nas plantas, não implica obrigatoriamente na redução da metilação em genes alvos. Em contrapartida, baixo nível de metilação é constantemente associado com a hipermetilação em um gene específico (YAISH, 2013). Dessa forma, a metilação ocasiona diferenças características durante o desenvolvimento das plantas, como a progressão do florescimento e respostas a fatores bióticos e abióticos.

O papel exercido pela metilação do DNA está intimamente relacionado ao estabelecimento de tal grupamento químico no genoma, a sua manutenção e posterior remoção do grupo metil da citosina. O estabelecimento de padrões ou marcas de

metilação estão associadas às enzimas metiltransferases do DNA que incluem também as enzimas responsáveis pela metilação *de novo* DNMT3A e DNMT3B no seu desenvolvimento inicial de ocorrência (JONES, 2012).

Considerando o organismo modelo, a *Arabidopsis thaliana*, a ação das enzimas que atuam no processo de desmetilação retrata que a reversibilidade apresentada pela molécula do DNA é importante para o processo regulatório dos genes durante todo o desenvolvimento da planta (PIKAARD & SCHEID, 2014).

As regiões de heterocromatina, apresentam grandes quantidades de elementos transponíveis e demais sequências repetitivas, e com isso tendem a serem mais metiladas em comparação com as regiões de eucromatina, que contém genes e regiões intergênicas não tanto repetitivas, resultam em menor ocorrência de 5-mC (DHAR et al., 2014). Quando a metilação se expressa na região promotora do gene resulta na ausência de transcrição do material genético.

Contornar os níveis de metilação ou desmetilação do DNA em locais específicos dispostos no genoma pode possibilitar regular não apenas a expressão do gene, mas também, os estados envolta da cromatina, comprometendo a fisiologia celular e a bioquímica (KUMAR, 2018).

O aparecimento da metilação do DNA ainda é incerto. Entretanto, em plantas, os contextos de manifestação são variados e a ocorrência da metilação tem relação com sequências repetitivas e com a inativação do processo de transcrição. Isso é mantido por meio da via de metilação do DNA comandada por RNA, ou seja, uma via epigenética de metilação do DNA mediada por meio do RNA nos organismos vegetais (PICARD & GEHRING, 2017).

A metilação do DNA tem alta variação dentro do mesmo tipo de célula e isso implica que uma determinada posição da citosina pode apresentar um padrão de metilação diferente de uma célula para outra no mesmo indivíduo (FENG & JACOBSEN, 2011).

O controle do nível de metilação que estará presente no DNA ocorre por meio da ação de dois componentes enzimáticos. Durante o processo de metilação do DNA, ela tem como característica se perpetuar ao longo das gerações. No entanto esse evento não permanece de forma infinita, mas o trecho do genoma que foi metilado pode voltar à sua condição como resultado da ação das desmetilases (GEHRING & HENIKOFF, 2008).

Vale destacar que a ocorrência da metilação nas regiões promotoras dos genes induz a repressão no modo atuante da expressão gênica. No entanto a redução da metilação do DNA nas regiões promotoras não resulta obrigatoriamente em um nível elevado da expressão gênica (ZHU et al., 2016).

Modificar a forma como os genes são ativos, alterando a conformação do DNA na célula, pode possibilitar a adaptação dos organismos dentro e entre gerações. A metilação no DNA constitui uma maneira de controle dos genes nos organismos, bem como, marcadores para demais proteínas associadas à ativação de genes (DUBIN et al., 2015).

Em *Arabidopsis* é comum a visualização de dois padrões de metilação do DNA. O primeiro é a ocorrência em todos os contextos de citosina dispostos nos elementos transponíveis e em outros DNAs repetitivos que estão presentes, em especial, nas regiões heterocromáticas pericentroméricas, e também em pequenos fragmentos entre genes na região eucromática, ocasionando a não transcrição do DNA. O segundo padrão de metilação ocorre nas regiões de transcrição ou também considerada como o corpo do gene. (FENG & JACOBSEN, 2011).

O padrão do nível de metilação é diferente entre as plantas e elas irão incidir de forma específica em cada uma delas, ou seja, a ocorrência e a manutenção da metilação do DNA é intimamente dependente de qual espécie está sendo analisada e em qual contexto ela se faz presente. Na etapa de replicação da molécula do DNA, as fitas que são metiladas serão separadas para a síntese de outras fitas e formarão, nesse caso, fitas hemimetiladas, ou seja, uma fita com a metilação e outra sem a presença do grupo metil disposto na citosina (JONES & LIANG, 2009).

A 5-mC é removida do DNA por mecanismos passivos ou ativos. Além disso, esse mecanismo está em processo dinâmico e faz parte do desenvolvimento, diferenciação e viabilidade celular dos organismos, com intensiva função no controle da expressão gênica (JONES, 2012).

A 5-mC pode atuar no bloqueio dos fatores de transcrição, prevenindo a transcrição ou recrutar complexos que atuem na modificação da cromatina, mediando o silenciamento gênico, de acordo com às alterações nas histonas subjacentes (GEHRING & HENIKOFF, 2008).

São notórias as diferenças entre os níveis e a expressão de metilação entre diferentes espécies e entre os indivíduos que a compõem, e isso podem estar associado à composição celular de cada um. Diferenças durante o processo

transcricional nos locus e o polimorfismo na sequência de DNA caracterizam entre 20 a 80% da variabilidade da metilação presente no DNA (HENIKOFF & GREALLY, 2016). Os resultados decorrentes da metilação do DNA são expressos em sua maioria na repressão funcional de genes nos organismos eucariotos.

Um estudo mais direcional para o papel da 5-mC disposta no DNA genômico advém de proteínas descobertas no reconhecimento de 5-mC e que vão realizar posteriores funções sobre elas. A descoberta da 5mC resultou no caráter mais abrangente sobre os efeitos da expressão gênica, e com isso pode representar um mecanismo importante em organismos superiores (CHEN et al., 2016).

É importante ressaltar que a regulação dos caracteres transcricionais na metilação do DNA tem ação de associação sob as demais marcas de metilação das histonas, pois as metiltransferases, desmetilases e os leitores para a 5-mC interagem com diversas marcas epigenéticas das histonas, bem como das enzimas que participam da etapa de modificação dessas (CHEN et al., 2016).

A ação da metilação do DNA sobre a expressão gênica recai sobre dois fatores, sendo eles: o silenciamento gênico transcricional (*Transcriptional Gene Silencing* - TGS), que promove a inibição da transcrição e está relacionado com a hipermetilação nas regiões promotoras, e o silenciamento gênico pós-transcricional (*Post Transcriptional Gene Silencing* - PTGS), ao qual não ocorre interferência na transcrição do gene, entretanto a expressão é acometida devido as moléculas de RNAs se tornarem instáveis. (XIAO et al., 2012; HAMMOND et al., 2001).

A ação do gene e o seu papel é interrompido e silenciado com a presença do grupamento químico epigenético, ocorrendo um silenciamento prévio. A partir do momento que esse fator químico é removido, a expressão do gene volta a sua condição normal. O silenciamento gênico decorrente da metilação é uma consequência do mecanismo nas suas regiões promotoras, ao qual o estado de hipometilação do promotor está condicionada à reativação do processo transcricional e diferente dos animais que a prevalência maior pela metilação é vista nas sequências simétricas, nos vegetais a metilação tem ocorrência tanto em sequências simétricas quanto assimétricas (ASHAPKIN et al., 2011).

A regulação gênica é parte fundamental e inerente no processo de desenvolvimento da planta e isso ocorre por meio de fatores regulatórios cis e trans. Dessa forma, a metilação do DNA participa de importantes processos nos organismos, como o silenciamento de transposons, a defesa de vírus e o *imprinting* genômico.

Metiltransferases e desmetilases participam do estabelecimento da metilação do DNA (SONG et al., 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, 1/3 dos genes apresentam a metilação nas regiões transcritas e os genes metilados nesta região são altamente expressos e ativos, e em relação a região promotora isso equivale a 5% com um maior grau de expressão tecidual (ZHANG et al., 2006). Além disso, a distribuição de citosinas metiladas tem uma maior prevalência no contexto CG totalizando 55%, seguido por 23% no contexto CNG e 22% no contexto CNN (LISTER et al., 2008).

A desmetilação pode ser necessária para que genes específicos sejam ativados ou que seja feita a redefinição do estado epigenético do genoma ao longo do desenvolvimento do organismo ou em respostas as interferências ambientais. O processo de desmetilação tendem a ser de duas formas: passiva – quando as metiltransferases se tornam inativas durante o ciclo celular, logo após o processo de replicação do DNA, ocasionando um estado não metilado na fita recém sintetizada. Já a desmetilação ativa tem ação de uma ou mais enzimas e é ocasionada independentemente da ocorrência da replicação do material genético. Essas enzimas destacam a desmetilase e de acordo com estudos realizados em plantas foi possível perceber uma subfamília de glicosilases no DNA que pode atuar na retirada da metilação por meio do reparo por excisão de base (ZHU, 2009).

Para o processo de excisão de base, as DNAs glicosilase clivam a ligação glicosídica entre a 5-mC e a desoxirribose, ocasionando um sitio AP. Em seguida, uma endonuclease AP remove a desoxirribose e DNA polimerase e ligase fazem o preenchimento nesse espaço. A via de reparo do processo de excisão de bases permite, então, a remoração da 5-mC por uma citosina sem o grupo metil (GEHRING & HEBIKOFF, 2008; ZHU, 2009).

A metilação desencadeia diferentes funções em genes relacionados ao desenvolvimento dos vegetais, como as interferências desencadeadas durante o processo de florescimento das plantas, a citar a ação sobre o gene *Lcyc* que encontra-se altamente metilado em espécies mutantes e essa metilação desencadeia alterações na ocorrência de ramos espontâneos, ocasionando a expressão reduzida do gene (TURCK, 2013).

O FWA (*FLOWERING LOCUS WAGENINGEN*) é um gene que atua durante a transição do período de desenvolvimento vegetativo para o período reprodutivo nos organismos vegetais, importante para a reprodução da planta. Foi encontrada uma

sequência de repetição denominada SINE presente na região promotora quando metilada, entretanto quando essa estrutura de repetição é desmetilada, ocorre a transcrição levando a expressão do gene FWA nos tecidos vegetativos e o processo tardio de florescimento. Com isso foi possível levantar a ideia de que a presença da sequência SINE induz a metilação na região promotora do FWA e as repetições dessa sequência levam ao aumento da metilação e conseqüentemente repressão do gene. Dessa forma, a ocorrência da metilação do DNA no processo regulatório de genes específicos pode ser conservada ao longo da evolução dos organismos e a extensão da metilação pode ser um modulador para os níveis de expressão gênica e levar a diferentes expressões de um gene de maneira a controlar uma característica de adaptação (TURCK, 2013).

A metilação do DNA, além de conferir um papel regulador, pode contribuir de forma significativa nos programas de melhoramento de plantas. Associado a isso, se faz importante a análise de técnicas eficazes no estudo desse caráter.

2.3 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA GOIABEIRA

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma frutífera pertencente à família Myrtaceae. Esta família apresenta cerca de 5500 espécies, classificadas em 144 gêneros e 17 tribos (WILSON et al., 2005; WILSON, 2011; WCSP, 2016), dispostas em diferentes lugares no mundo.

O gênero *Psidium* apresenta uma ampla variedade de habitats naturais, com três centros de diversidade: índias ocidentais, em especial Cuba e a ilha Espaniola; o sul do Brasil e o Paraguai, e por fim, o norte da América do Sul, englobando Peru, Venezuela e as Guianas Francesas (SOARES-SILVA & PROENÇA, 2008). No Brasil, as regiões Sudeste e central do país se destacam como as regiões de maior diversidade de espécies do gênero (POMMER & MURAKAMI, 2009).

Psidium guajava L. ($2n = 22$) é a espécie do gênero com maior valor econômico. Acredita-se que seja originária do Sul do México ou da América Central (CUNHA et al., 2012), com boa distribuição nas regiões tropicais do continente americano (RISTERUCCI et al., 2005).

O fruto da goiabeira, a goiaba, é arredondado ou oval, similar a uma pera. Durante o período de amadurecimento, a cor da casca oscila entre verde e amarelo.

A cor da polpa pode ser branca ou vermelha, o que remete aos teores de pigmentos carotenóides como o licopeno ou β -caroteno (CUNHA et al., 2012). Todas essas características estão associadas a cada cultivar.

O fruto é rico em diversos compostos nutricionais, como vitamina A e B. Apresenta alta concentração de vitamina C, o que a torna superior aos frutos cítricos (POMMER e MURAKAMI, 2009). O teor de vitamina C varia de 180 a 300 mg/g, maior que o de frutas cítricas, como a laranja, que apresenta cerca de 100 mg/g de fruta (OLIVEIRA et al., 2012). A pectina é outro composto que se destaca, responsável pela alta quantidade de fibras solúveis e insolúveis encontradas no fruto.

Devido às suas características nutricionais e sabor, a goiaba pode ser utilizada tanto para consumo *in natura* quanto em indústrias, como para a fabricação de sucos, doces, geleias, compotas e biscoitos, constituindo importante fonte econômica. Entretanto, a vida curta pós-colheita apresentada pelo fruto, torna-se uma limitação para a conquista da comercialização no mercado mundial (GILL et al., 2015).

Além do fruto, outras partes da planta também são utilizadas, com destaque para o uso medicinal, construção civil e na obtenção de óleo essencial, devido à presença de importantes elementos químicos e do seu efeito biológico (GUTIÉRREZ et al., 2008).

O Brasil é um dos dez principais produtores de goiaba do mundo. Em 2016 foram colhidas 414.960 toneladas do fruto em 17.119 hectares, havendo uma diminuição de 2,2% em relação ao ano de 2015. As regiões Nordeste, Sudeste e Sul se destacam como as regiões com a maior produção da cultura. No Estado do Espírito Santo, foram colhidas 7.122 toneladas do fruto em 361 hectares (IBGE, 2018). Além do Brasil, países como a Índia, Paquistão, Egito e Venezuela também se destacam na produção do fruto.

Dentre o total de cultivares de goiabeiras presentes em todo o mundo, apenas algumas são produzidas e comercializadas (CUNHA et al., 2012). As variedades Paluma e Rica, destinadas ao consumo industrial, e as variedades Sassaoka e Pedro Sato, para o consumo *in natura*, são destaque no país (OLIVEIRA et al., 2012).

A época de florescimento das goiabeiras varia em função das condições climáticas nos locais de cultivo. Os botões florais costumam ser formados de 47 a 70 dias após a realização da poda, e os frutos começam a ser produzidos após 90 dias contados a partir da poda (OLIVEIRA et al., 2012). Para locais de clima tropical, o

florescimento pode ocorrer durante todo o ano, não sofrendo alterações de período de floração devido a umidade e a temperatura (CUNHA et al., 2012).

A planta consegue chegar a 10 metros de altura e sua principal forma de propagação é a vegetativa, entretanto a propagação seminal ainda é praticada em menor proporção (COSER et al., 2014). Os aspectos vegetativos e reprodutivos de espécies vegetais proporcionam uma base informativa para a condução de práticas em espécies vegetais, visando aumento de produção e a sua correlação entre o fenótipo e a expressão de características gênicas (SILVA, 2017). Considerando os estudos realizados em epigenética é possível perceber que abordagem em plantas frutíferas em diferentes sistemas de cultivo são raros, com isso, a relação entre o fenótipo e a expressão gênica pode ser evidenciada mediante a caracterização e efeitos de mecanismos epigenéticos presentes na cultura.

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ANÁLISE DE 5-mC

O estudo da metilação do DNA em organismos vegetais, visando quantificar o nível de 5-mC em diferentes espécies, é importante para a compressão de fatores epigenéticos, bem como, perceber o estado desse mecanismo no genoma.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando propor técnicas eficientes na detecção da metilação na sequência de DNA, tanto numa perspectiva ampla, como em sequências específicas dispostas no genoma. A detecção da metilação tem como objetivo, identificar mudanças decorrentes nos organismos e de qual forma isso pode refletir no fenótipo. Nos últimos anos, tem-se crescente a análise de metilação no âmbito do DNA global, a partir da utilização de sistemas cromatográficos.

A técnica de estudo por meio da cromatografia foi trazida inicialmente pelo químico D. T. Day em 1900, desenvolvendo a cromatografia em coluna (AQUINO NETO e NUNES, 2003). Esta técnica constitui-se um método físico-químico utilizado para a dissociação de componentes presentes em uma determinada mistura, distribuindo-os em duas fases. Uma fase permanece estacionária e a outra se move através dela ocorrendo a retenção dos compostos por períodos diferentes, ocasionando migrações em tempos distintos dos componentes avaliados (COLLINS et al., 2006).

Para análise de mecanismos epigenéticos ocasionados no genoma em escala global, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) constitui uma ferramenta eficaz para o estudo do comportamento de metilação do DNA.

A análise por meio da cromatografia tem se expandido. Ela é utilizada para a separação e purificação de bases nitrogenadas moleculares, sendo possível fazer o estudo dos nucleosídeos, sem causar muitos danos, através da hidrólise ácida, permitindo com isso, quantificar e separar os compostos como a citosina e a 5-mC (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

Esse tipo de cromatografia possibilita compreender ao exato, através da análise quanto de citosinas metiladas estão presentes na sequência de DNA. A hidrólise é feita por meio de método químico ou enzimático convertendo os desoxirribonucleotídeos individuais em desoxirribonucleosídeos, com prévia remoção das moléculas de RNA, de forma a evitar contaminação e interferir no resultado final (CHEN et al., 2013).

Os componentes presentes na molécula de DNA são separados por meio da CLAE e quantificados a partir de um detector ultravioleta (UV) pela utilização de padrões externos com concentrações conhecidas do composto a ser analisado. É possível detectar, além da 5-metilcitosina para estudos de metilação, outras bases modificadas que apresentem significado biológico (JOHNSTON, 2005). Além disso, o uso da CLAE com sistema UV constitui a principal ferramenta para quantificar o nível de citosinas desoxicidina (dC) e metiladas (5mC) presentes no DNA hidrolisado de uma amostra em análise (KURDYUKOV & BULLOCK, 2016).

Dessa forma, a utilização desta técnica para a análise de compostos químicos, torna-se uma ferramenta eficaz devido as suas diversas vantagens, como a redução no tempo de análise, alta resolução na identificação de vários compostos em diferentes quantidades, eficiência na análise, obtenção de análises quantitativas de fácil realização e alta precisão, boa detectabilidade dos componentes avaliados. A análise em CLAE permite uma ampla escala de utilização, considerando os compostos e a natureza das amostras, além da realização de análises automatizadas através de computadores acoplados que permitem comparar os tempos de retenção, a concentração e o desempenho cromatográfico realizado (COLLINS et al., 2006).

Apesar de não ser possível perceber alterações sutis no genoma decorrente da metilação, a análise em escala global do genoma constitui uma ferramenta eficaz de compreensão dos efeitos epigenéticos sobre os organismos a partir das respostas

relacionadas as condições como estresse e aclimatização dos vegetais (JOHNSTON, 2005).

É possível perceber que, quando não existem informações acerca de quais sequências do genoma apresentam padrões de citosina metilada, a análise de metilação global através de um método quantitativo de fácil aplicação e precisão, possibilita a obtenção inicial de conteúdo informativo e organismos não-modelos (ROZHON et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Mensurar os níveis de 5-mC em genótipos de goiabeiras em diferentes estágios de desenvolvimento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar se o mecanismo epigenético de 5-mC atua de forma significativa nas fases de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de um ciclo de produção em goiabeiras adultas em campo;

Verificar se os genótipos de goiabeiras influenciam no perfil global 5-mC;

Identificar se existe variação no conteúdo de metilação global da 5-mC em diferentes tecidos vegetais;

Relacionar o perfil de 5-mC nos genótipos de *Psidium guajava* L. com caracteres vegetativos e reprodutivos avaliados durante um ciclo de produção.

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1 Delineamento experimental e material vegetal

O pomar experimental foi conduzido na comunidade de Palmeira, localizada na cidade de Mimoso do Sul – Espírito Santo (latitude de 21°01'12,99" S e longitude 41°17'13,48W a 250 m de altitude). O pomar foi instalado em março de 2012, em delineamento em blocos casualizados com 22 genótipos de goiabeiras (Tabela 1), dispostos em três blocos com duas plantas por parcela, constituindo 44 plantas em cada bloco e 132 plantas no total. Para as análises de 5-mC foram usadas as primeiras plantas de cada genótipo por bloco.

O tecido foliar foi coletado em plantas a partir de 38 meses após o plantio, na segunda poda de produção. As coletas das folhas foram feitas em cinco fases, contabilizados em dias após a poda (DAP) – 54 DAP, 91 DAP, 119 DAP, 182 DAP e 302 DAP – que representaram os respectivos períodos da planta: pós-poda, florescimento, frutificação, colheita e pós-colheita (Figura 2). Folhas completamente desenvolvidas foram coletadas ao redor da planta e na mesma altura, e acondicionadas em nitrogênio líquido para transporte e em seguida armazenadas a -80°.

Tabela 1. Descrição dos 22 genótipos de goiabeira utilizados no estudo. As variáveis cor da polpa, textura da casca, massa do fruto, massa e rendimento da polpa foram descritas no trabalho de Silva (2017).

| Genótipo | Abreviação | Tipo | Cor da Polpa | Textura da casca | Massa do fruto (g) | Massa da Polpa (g) | Rendimento de polpa (%) |
|------------------------------|------------|----------------|--------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| Cortibel Lisa Grande | CLG | Comercial | Vermelha | Lisa | 206,9 | 148,1 | 73,1 |
| Cortibel Lisa Média | CLM | Comercial | Vermelha | Lisa | 143 | 106,2 | 74 |
| Cortibel 3 | CIII | Seleção massal | Vermelha | Rugosa | 155 | 110,4 | 70,7 |
| Cortibel Branca Lisa Grande | CBLG | Comercial | Branca | Lisa | 164,4 | 121 | 72,7 |
| Cortibel 5 | CV | Seleção massal | Vermelha | Semi-Lisa | 129,9 | 93,4 | 71,7 |
| Cortibel Rugosa Média | CRM | Comercial | Vermelha | Rugosa | 174,8 | 132,4 | 74,9 |
| Cortibel 7 | CVII | Seleção massal | Vermelha | Rugosa | 159,9 | 115,1 | 71,9 |
| Cortibel Branca Rugosa Média | CBRM | Comercial | Branca | Rugosa | 167,9 | 122 | 72,4 |
| Cortibel 9 | CIX | Seleção massal | Vermelha | Rugosa | 173,3 | 131,5 | 75,4 |
| Cortibel 10 | CX | Seleção massal | Vermelha | Semi-Lisa | 135,4 | 97,89 | 71,8 |
| Cortibel 11 | CXI | Seleção massal | Vermelha | Semi-Lisa | 172 | 120,1 | 70,3 |
| Cortibel 12 | CXII | Seleção massal | Branca | Rugosa | 132,4 | 85,6 | 65,5 |
| Cortibel 13 | CXIII | Seleção massal | Vermelha | Semi-Lisa | 145,5 | 106,4 | 72 |
| Cortibel Rugosa Grande | CRG | Comercial | Vermelha | Rugosa | 193,6 | 145,3 | 74,5 |
| Cortibel Semi-Lisa Grande | CSLG | Comercial | Vermelha | Lisa | 193,9 | 148,1 | 76,7 |
| Cortibel 16 | CXVI | Seleção massal | Branca | Lisa | 149 | 111,4 | 74 |
| Cortibel 17 | CXVII | Seleção massal | Vermelha | Semi-Lisa | 162,8 | 121,8 | 74,3 |
| Sassaoka | SSK | Comercial | Vermelha | Rugosa | 140,3 | 98,46 | 70,1 |
| Pedro Sato | PS | Comercial | Vermelha | Semi-Lisa | 180,7 | 134,6 | 73,9 |
| Século XXI | SXXI | Comercial | Vermelha | Semi-Lisa | 165,8 | 117,5 | 70,4 |
| Paluma | Paluma | Comercial | Vermelha | Semi-Lisa | 153,4 | 107,8 | 70,3 |
| Roxa | Roxa | Comercial | Roxa | Rugosa | 102,6 | 71,3 | 69,5 |



Figura 2. Fases analisadas sobre o desenvolvimento das goiabeiras. A: Pós-poda, B: Florescimento, C: Frutificação, D: Colheita, E: Pós-colheita.

Os genótipos Cortibel Rugosa Média, Cortibel 11, Cortibel Rugosa Grande, Paluma e Século XXI foram utilizados para a análise do nível de 5-mC em diferentes tecidos nas plantas com 68 meses a partir do tecido foliar coletados no mesmo dia. Os tecidos vegetais avaliados foram gema apical, folha nova, folha desenvolvida, galho e botão floral (Figura 3).



Figura 3. Tecidos de goiabeira analisados para o %5-mC. A: Gema apical, B: Folha nova, C: Folha desenvolvida, D: Galho, E: Botão floral.

4.2. Avaliação de 5-mC por CLAE

4.2.1 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico, foi utilizado o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações. O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 700 μ l da solução tampão de extração (NaCl -1,4 mol/L, Tris-HCl pH 8,0 – 100 mmol/L, EDTA pH 8,0 – 20 mmol/L, PVP - 1%, CTAB - 2%, β -mercaptoetanol - 0,2%, água de osmose reversa) e incubado à 37 °C em banho seco por 30 min. Em seguida adicionou-se 650 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), homogeneizado a mão por 10 min e centrifugado por 9 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 2,0 mL. Adicionou-se 200 μ L de tampão

de extração e 650 µL de CIA e homogeneizou-se novamente por 5 min. A solução foi centrifugada por mais 9 min a 10.000 rpm. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 ml, adicionando 620 µL de CIA e centrifugado por mais 10.000 rpm por 9 min. O sobrenadante foi adicionado a novos tubos de 1,5 ml e o DNA precipitado com 500 µl de isopropanol gelado, mais 230 µL de acetato de amônio e homogeneizado por 5 min. A mistura foi centrifugada por 10.000 rpm por 9 min. Nessa fase foi formado o pellet e o sobrenadante foi descartado. Utilizando 250 µL de etanol 70%, foi feita a lavagem do *pellet* por três vezes, centrifugando à 12000 rpm por 3 min a cada lavagem. Em seguida foi feita a secagem do *pellet* incubando-o por 1h:30 min a 37°C. Para a eliminação de resquícios de RNA, o DNA foi ressuspensão em 30 µL de TE com RNase (40 µg/mL) e mantido em banho-maria a 37°C por 30 min. A qualidade e a concentração do DNA foram estimadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® com a absorbância na relação 260/280 na faixa de 1,8 a 2,0.

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para a quantificação da 5-mC nas folhas coletadas nos diferentes períodos, utilizou-se uma metodologia global via CLAE. Para tanto, após a etapa de quantificação do DNA genômico, o mesmo foi ajustado a uma quantidade de 30 µg de DNA em 100 µL de água. A hidrólise ácida do DNA obtido foi realizada adicionando 50 µL de ácido perclórico 70% (v/v) e aquecimento a 100 °C em banho-maria por 60 minutos e posterior ajuste do pH (3 – 5) (CHEN et al., 2013).

A análise cromatográfica foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo Shimadzu LC - 20AT, detector de arranjo de fotiodo (Shimadzu SPD - M20A), coluna C₁₈ de aço inox (Shimadzu VP - ODS Shim-pack 250 mm x 4,6 mm d. i., 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel operou em forma isocrática e foi constituída de solução aquosa de KH₂PO₄ 50 mmol L⁻¹ com pH 5,8; fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O comprimento de onda utilizado foi de 285 nm (CHEN et al., 2013). Após análise, o sistema cromatográfico foi limpo com um fluxo de água ultrapura (18,2 MΩ.cm) de 0,5 mL min⁻¹ por 15 minutos, seguido de 15 minutos, no mesmo fluxo, de 90/10 (v/v) de metanol/água ultrapura.

A quantificação da citosina (C) e 5-mC foi realizada pelo método do padrão externo. As soluções padrão estoque de C e 5-mC, foram preparadas utilizando

padrões (Sigma-Aldrich) de 99% de pureza. As concentrações finais foram de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de citosina e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 5-metilcitosina. A partir dessas soluções foram preparadas soluções de trabalho para a realização da curva-padrão utilizando seis concentrações variando de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de C e 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 5-mC. Para o cálculo da porcentagem de 5-mC no DNA foi realizado de acordo com a equação: $\%5\text{-mC} = [5\text{-mC} / (\text{C} + 5\text{-mC})] \times 100$.

4.3 Avaliações fenotípicas

Após a poda de produção, foram selecionados e marcados quatro ramos, que, concomitantemente durante o período de realização das coletas das folhas, foram avaliados caracteres vegetativos e reprodutivos nos ramos e obtida a média para cada variável analisada. Aos 54 dias após a poda foram avaliados os caracteres vegetativos: número de brotos no ramo ao ano (NBRA) - quantidade de brotos emitidos; comprimento dos brotos nos ramos ao ano (CBRA) - comprimento de cinco brotos selecionados aleatoriamente em centímetros. Os caracteres reprodutivos foram avaliados a partir de 91 dias após a poda, no qual foram avaliados: número de botão floral (NBF) e flor aberta (FA) - quantidade de ambas as características reprodutivas avaliadas em ramos previamente marcados. Aos 119 dias foi avaliado o número de frutos - quantidade de frutos formados presentes nos ramos marcados nas plantas. A produção foi obtida mediante o peso em quilogramas do total de frutos obtido em cada genótipo durante o ciclo.

4.5 Análises estatísticas

O experimento foi instalado em delineamento experimental de blocos ao acaso com 22 genótipos de goiabeiras, sendo que cada parcela foi composta por duas plantas. Neste trabalho, para avaliação da metilação, trabalhou-se com uma planta por repetição via análise em esquema fatorial 22 x 5 (Fator 1: genótipos; Fator 2: fase de desenvolvimento).

Os dados coletados foram analisados através da análise de variância e as médias foram comparadas pelos testes de médias de Tukey e Scott-Knott a 5% de probabilidade. A escolha do método para o teste de média baseou-se no número de tratamentos dentro de cada desdobramento.

Os dados foram padronizados e submetidos à análise multivariada, calculando a matriz de dissimilaridade pelo método de Mahalanobis dos 22 genótipos com os dados de %5-mC dos cinco períodos de coleta. Posteriormente, foi realizado o agrupamento dos genótipos pelo método *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA) (SNEATH & SOKAL, 1973). Os resultados são apresentados em formato *heatmap*.

Os dados fenotípicos foram submetidos à análise de correlação de Pearson (r), testado a significância pelo método de “t”. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do software de ambiente livre R (2018) associado ao uso dos pacotes, ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2013), e o programa Genes (CRUZ, 2012).

5. RESULTADOS

5.1 Variação do perfil de metilação global nas fases de desenvolvimento de goiabeiras

A média geral de metilação global em goiabeira foi de 20,27%, variando entre os genótipos de 16,34% a 26,14% (Tabela 2) e de 19,90% a 20,99% entre as fases estudadas.

Tabela 2. Percentual de 5-mC de 22 genótipos de goiabeiras em cinco fases de desenvolvimento da planta em um ciclo de produção.

| Genótipo | Fases de Desenvolvimento | | | | | Média |
|--------------|--------------------------|---------------|--------------|----------|-------------------|-------|
| | Vegetativo | | Reprodutivo | | Vegetativo | |
| | Pós - poda | Florescimento | Frutificação | Colheita | Pós - colheita | |
| CLG | 20,85 | 21,56 | 21,73 | 19,82 | 21,21 | 21,03 |
| CLM | 19,26 | 19,30 | 19,14 | 22,76 | 22,69 | 20,63 |
| CIII | 20,29 | 20,33 | 23,78 | 20,80 | 22,17 | 21,47 |
| CBLG | 22,16 | 21,12 | 18,69 | 20,00 | 16,98 | 19,79 |
| CV | 21,72 | 18,10 | 19,69 | 19,45 | 19,68 | 19,73 |
| CRM | 21,79 | 21,42 | 21,65 | 21,99 | 24,65 | 22,30 |
| CVII | 14,43 | 14,40 | 20,95 | 14,72 | 17,22 | 16,34 |
| CBRM | 21,80 | 19,04 | 19,07 | 21,30 | 17,73 | 19,79 |
| CIX | 20,41 | 20,28 | 18,21 | 22,18 | 21,14 | 20,44 |
| CX | 16,67 | 20,94 | 24,07 | 19,14 | 10,94 | 18,35 |
| CXI | 17,66 | 19,99 | 18,96 | 19,62 | 22,01 | 19,65 |
| CXII | 16,62 | 19,80 | 19,52 | 20,49 | 23,12 | 19,91 |
| CXIII | 16,30 | 20,73 | 18,27 | 17,53 | 10,66 | 16,70 |
| CRG | 17,54 | 19,90 | 17,41 | 22,16 | 21,70 | 19,74 |
| CSLG | 13,70 | 21,65 | 22,01 | 20,65 | 21,99 | 20,00 |
| CXVI | 24,15 | 20,75 | 22,40 | 17,86 | 21,53 | 21,34 |
| CXVII | 16,67 | 17,64 | 18,50 | 14,59 | 17,64 | 17,01 |
| Roxa | 31,21 | 19,12 | 22,19 | 19,77 | 21,31 | 22,72 |
| Sassaoka | 35,78 | 23,53 | 25,26 | 22,81 | 23,56 | 26,19 |
| Pedro Sato | 28,58 | 21,78 | 21,73 | 18,06 | 21,15 | 22,26 |
| SécXXI | 22,35 | 19,27 | 20,93 | 20,37 | 22,70 | 21,12 |
| Paluma | 21,94 | 18,02 | 16,45 | 21,66 | 19,16 | 19,45 |
| Média | 20,99 | 19,94 | 20,48 | 19,90 | 20,04 | 20,27 |

Embora sem diferenças significativas observadas entre as fases estudadas (Figura 4), verificou-se que os períodos vegetativos (Pós-poda e Pós – colheita) apresentaram os maiores desvios padrões quanto ao perfil de metilação global em comparação com os períodos reprodutivos (Florescimento, Frutificação e Colheita). Os valores encontrados para os genótipos nas fases de pós-poda e pós-colheita foram de 13,70% a 35,78% e 10,66% a 24,65% de 5-mC, respectivamente.

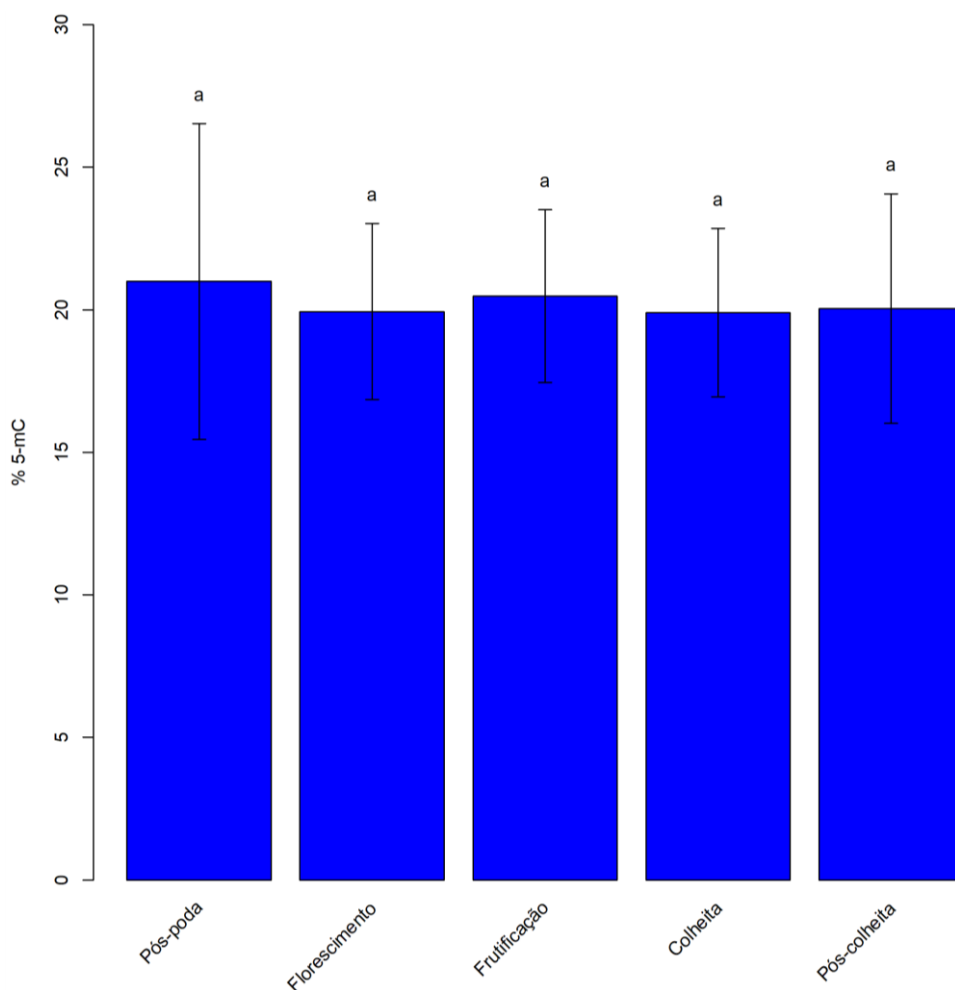


Figura 4. Percentual de 5-mC nas fases pós – poda (54 dias após a poda - DAP); florescimento (91 DAP), frutificação (119 DAP), colheita (182 DAP), pós – colheita (302 DAP), ao longo de um ciclo de produção em pomar experimental com 22 genótipos de goiabeiras. As barras denotam o desvio padrão para cada fase. Letras iguais não diferem entre si.

Os 22 genótipos de goiabeiras foram analisados quanto ao percentual de 5-mC e as diferenças observadas estão apresentados na Figura 5.

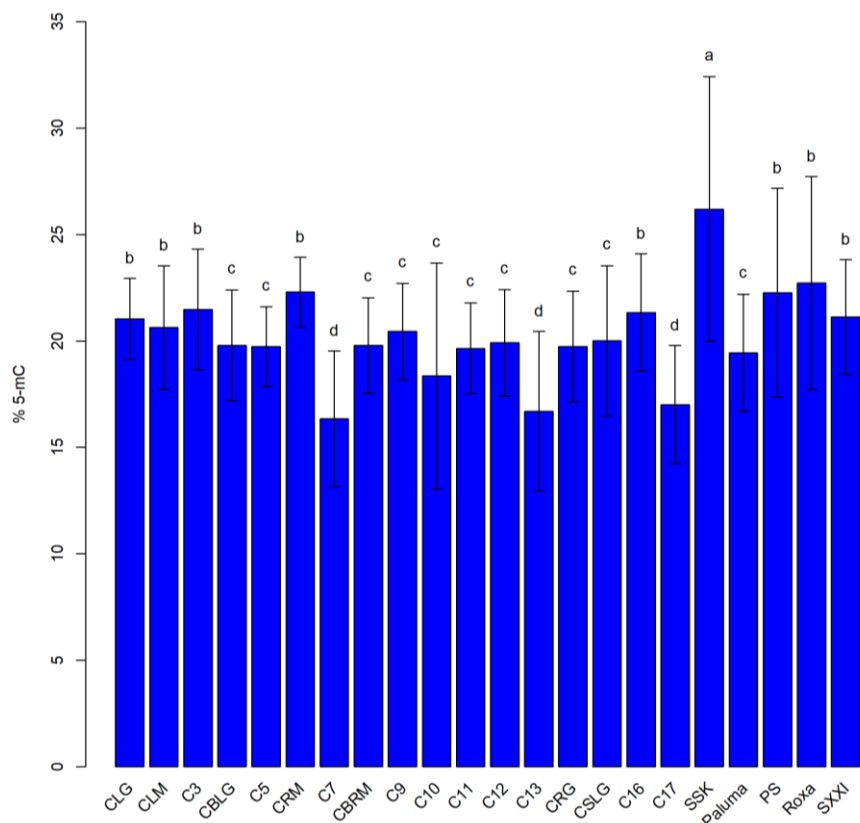


Figura 5. Porcentagem média de 5-mC em 22 genótipos de goiabeiras, considerando as cinco fases estudadas (Pós-poda, florescimento, frutificação, colheita e pós-colheita). As barras apresentam os desvios padrões obtidos em três repetições nas cinco coletas em fases vegetativas e reprodutivas, totalizando 15 dados por genótipo. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Através da análise dos resultados obtidos, percebeu-se a cultivar comercial Sassaoka em média (26,19%) superior aos demais genótipos quanto ao conteúdo global de citosina metilada, evidenciando a condição de hipermetilação em relação aos demais genótipos. A maioria das cultivares comerciais (CLG, CLM, CIII, CRM, CXVI, Pedro Sato, Roxa e Século XXI) agrupando-se no grupo com a segunda maior média de 5-mC global (Figura 5). Os genótipos (CBLG, CV, CBRM, CIX, CX, CXI, CXII, CRG, CSLG, Paluma) não diferiram entre si pelo teste quanto as médias. Os genótipos mais hipometilados foram CVII, CXIII, CXVII (Figura 5). Os genótipos Sassaoka, Cortibel X, Pedro Sato e Roxa possuíram os maiores desvios padrões considerando as cinco fases estudadas, evidenciando maior variação do mecanismo epigenético estudado nestes genótipos durante o ciclo de produção (Figura 5).

Verificou-se interação da metilação global de citosina nos genótipos em função das fases do desenvolvimento estudado. O desdobramento do efeito da interação foi realizado e apresentado de forma gráfica (Figura 6). Das cinco fases estudadas, em quatro (pós-poda, frutificação, colheita e pós-colheita) houve diferenças estatísticas entre genótipos. As fases reprodutivas foram as de maior uniformidade dos genótipos quanto a metilação global do DNA, com destaque para a fase do florescimento, na qual não houve diferenças significativas entre genótipos. Nesta fase alto desvio foi verificado para os genótipos CX e Sassaoka.

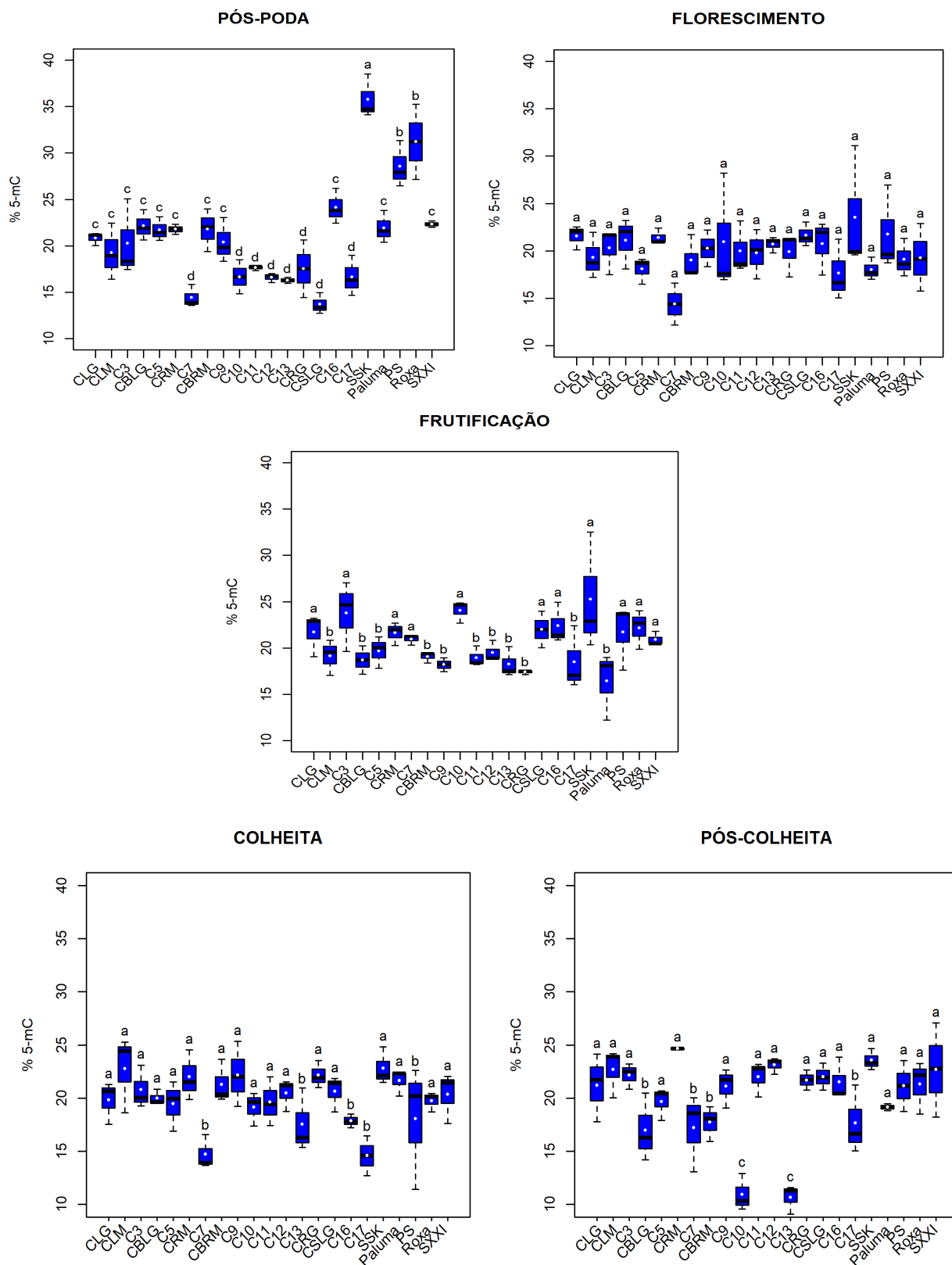


Figura 6. Análise dos genótipos dentro de cada nível de desenvolvimento da espécie. As análises em boxplots representam o percentual global de 5-metilcitosina dos genótipos em cada fase estudada, com os desvios padrões e seu respectivo teste de médias obtidas por meio de Scott-Knoot a 5% de significância.

Na fase pós-poda (54 DAP), período de intenso crescimento vegetativo, os genótipos apresentaram maior variação no perfil global de metilação (13,70% a 35,78%), formando quatro grupos de genótipos considerando as médias. Este resultado evidencia que em goiabeiras a fase de intenso crescimento vegetativo apresenta maior instabilidade no mecanismo epigenético de metilação da citosina entre genótipos. O genótipo Sassaoka foi o mais hipermetilado nesta fase (35,78% de 5mC) diferindo estatisticamente dos demais e seguido pelos genótipos Pedro Sato e Roxa que não diferiram estatisticamente entre si. Os genótipos CLG, CLM, CIII, CBLG, CV, CRM, CBRM, CIX, CXVI, Paluma e Século XXI não diferiram estatisticamente. Os genótipos mais hipometilados foram CVII, CX, CXI, CXII, CXIII, CRG, CSLG e CXVII, dos quais apenas um comercial.

Ao longo do florescimento, frutificação e colheita, verificou-se maior homogeneidade do comportamento dos genótipos quanto à metilação global da citosina, constatado pela menor variação da característica mensurada entre os genótipos. Assim, na fase de pleno florescimento (91 DAP) não houve diferenças estatísticas significativa entre os genótipos, que variaram entre 14,40% a 23,53% de 5-mC.

Na fase de frutificação (119 DAP) os genótipos agruparam-se em dois grupos sendo os mais metilados os genótipos CLG, CIII, CRM, CVII, CX, CSLG, CXVI, Sassaoka, Pedro Sato, Roxa e Século XXI. Os genótipos de menor metilação global do DNA foram CLM, CBLG, CV, CBRM, CIX, CXI, CXII, CXIII, CRG, CXVII e Paluma.

Durante a colheita (182 DAP), as médias variaram de 14,59% a 22,81% de 5-mC. Os genótipos CLG, CLM, CIII, CBLG, CV, CRM, CBRM, CIX, CX, CXI, CXII, CRG, CSLG, Sassaoka, Paluma, Roxa e Século XXI apresentaram as maiores médias, diferindo dos demais que variaram de 14,59% a 18,06% de 5-mC (CVII, CXIII, CXVI, CXVII e Pedro Sato).

Para o período vegetativo de Pós-colheita (302 DAP), houve maior variação entre os genótipos em relação às fases de período reprodutivo. A metilação global em torno de 19,16% a 24,65% foi detectada para os genótipos CLG, CLM, CIII, CV, CRM, CIX, CXI, CXII, CRG, CSLG, CXVI, Petri, Paluma, Pedro Sato, Roxa, Século XXI que não diferiram entre si. No entanto, houve diferenças significativas em comparação com as duas cultivares brancas (CBLG e CBRM), o genótipo CVII e CXVII. O genótipo CVII apresentou baixos valores de metilação em todas as fases, a exceção da frutificação, comportamento similar ao genótipo CXVII. Os genótipos CX e CXIII

apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto aos demais, demonstrando expressiva redução na metilação global para 10,94% e 10,66%, respectivamente.

Considerando a análise dos genótipos por fase, a maioria dos genótipos não apresentaram diferenças de médias do conteúdo de metilação global entre as fases estudadas (Sup 1). Entretanto, dez genótipos apresentaram interação significativa entre fases (Figura 7), sendo evidenciado dois comportamentos distintos. Um com genótipos com menor valor de %5-mC na fase pós-poda e aumento progressivo nas demais fases (genótipos CVII, CX, CXII, CXIII e CSLG). Em outro a maior porcentagem de metilação global ocorreu na fase pós-poda (Cortibel XVI, Sassaoka, Paluma, Pedro Sato e Roxa). Os genótipos CXII e CSLG apresentaram um percentual de 5-mC geralmente constante ao longo do desenvolvimento reprodutivo.

A Cortibel VII manteve o percentual de 5-mC similar nos períodos de pós-poda, florescimento e colheita, com maior valor na fase de frutificação, seguido pela pós-colheita. Esse mesmo comportamento durante a frutificação foi observado para a Cortibel X, que apresentou o menor nível de 5-mC no período de pós colheita, da mesma forma que foi retratada na Cortibel XIII.

Houve um comportamento similar, estatisticamente igual, para os períodos de florescimento, frutificação e colheita conforme observado para Cortibel XII e Cortibel XIII, diferindo esta última pela similaridade também para a fase de pós-poda. Os genótipos Cortibel SLG, Sassaoka, Pedro Sato e Roxa não diferiram estatisticamente entre si para as quatro últimas fases de desenvolvimento, diferindo apenas no período de pós-poda.

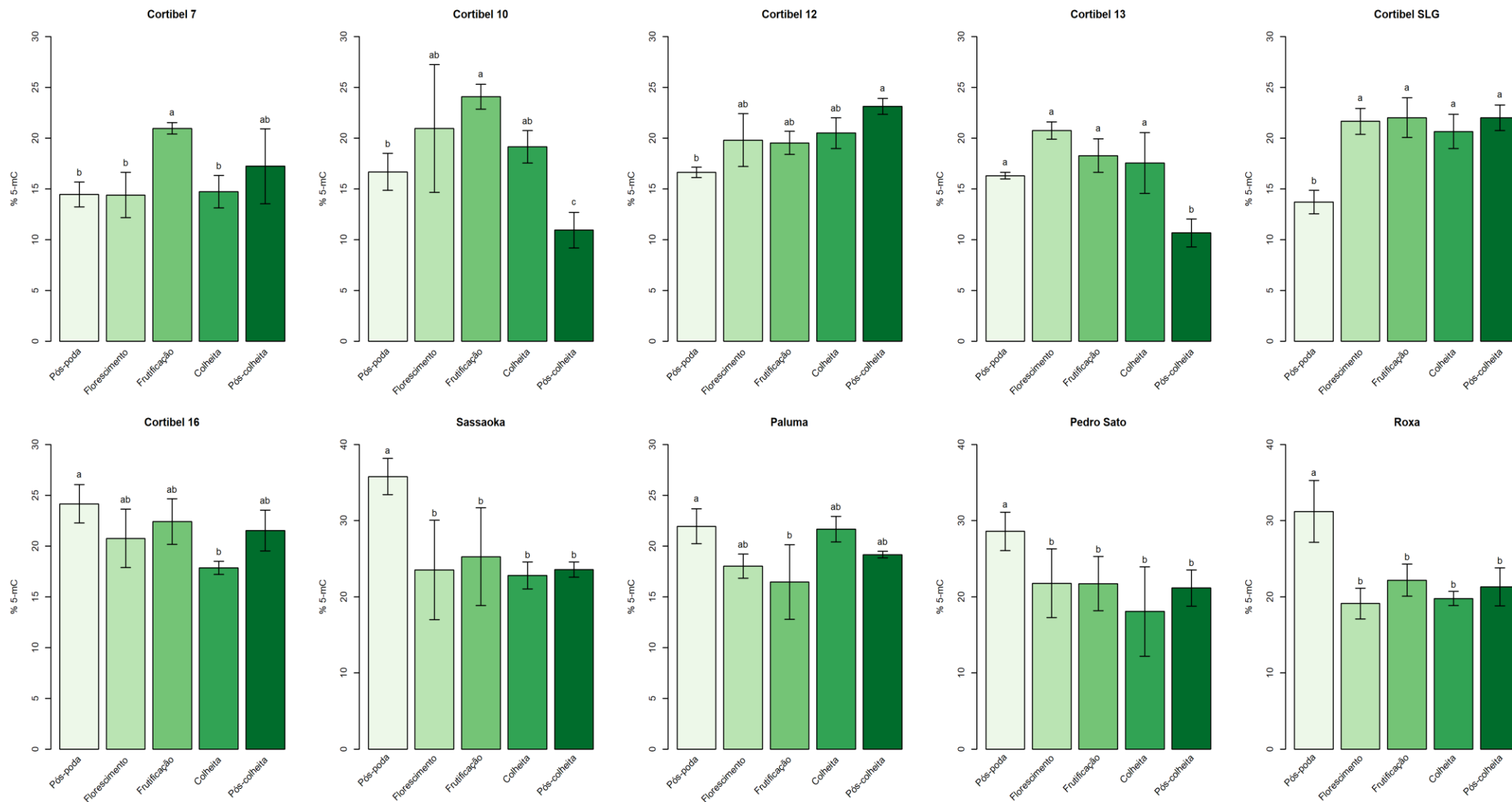


Figura 7. Genótipos que apresentaram interação entre as fases de desenvolvimento e o conteúdo de 5-mC. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível 1% de significância.

Ao analisar os níveis de 5-mC nos 22 genótipos avaliados através da análise de agrupamento em UPGMA, foi possível perceber a formação de dois grupos principais (Figura 8). Um dos grupos foi composto pelos genótipos de cultivares comerciais Sassaoka, Pedro Sato e Roxa e o segundo grupo formado envolveu os 17 genótipos de Cortibel, além de Século XXI e Paluma.

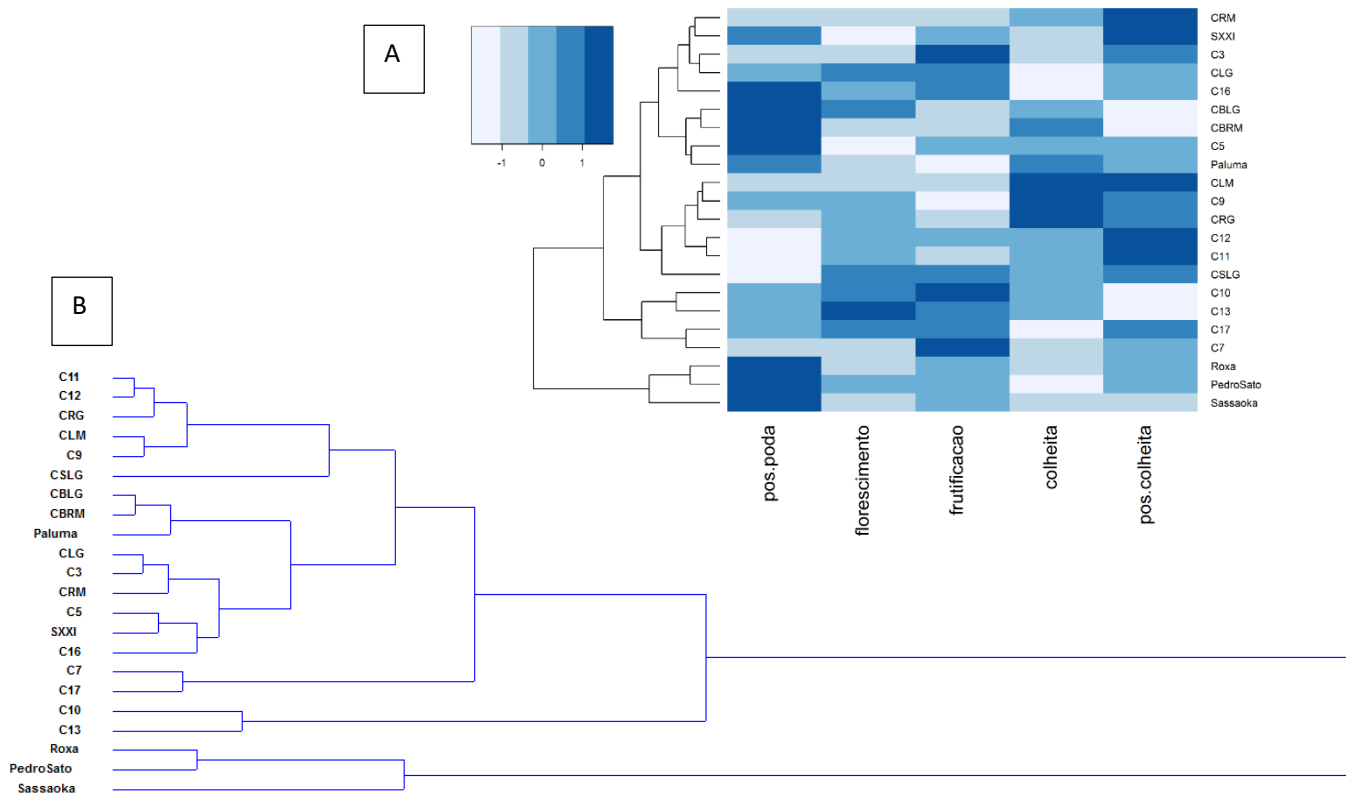


Figura 8. A: *Heatmap* demonstrando o percentual de 5-mC para cada genótipo nas cinco fases de desenvolvimento ao longo do ciclo de produção. A escala de cores determina quanto mais escuro maior a % 5-mC. B: dendograma dos grupos formados de acordo com o percentual de 5-mC considerando os níveis de metilação dispostos nas cinco fases de desenvolvimento de *Psidium guajava* L.

Com base no ponto de corte de 15% no nível de fusão dos grupos no dendograma (Figura 6B), o maior grupo se subdividiu em seis subgrupos menores: CXI, CXII, CRG, CLM, CIX (grupo I), CSLG (Grupo II), paluma, CBRM, CBLG (Grupo III), CXVI, Século XXI, CV, CRM, CIII, CLG (Grupo 4), CXVII, CVII (Grupo 5), CXIII, CX (Grupo 6). E o menor grupo se dividiu em Pedro Sato e Roxa (Grupo 7) e Sassaoka (Grupo 8).

Para que pudesse visualizar os níveis de 5-mC em decorrência dos diferentes genótipos avaliados a partir da análise de agrupamento, foi gerado um gráfico em formato *heatmap*. O gráfico em heatmap mostra um gradiente de cores, ao qual a cor mais forte representa os maiores percentuais de 5-mC nos genótipos e as cores mais fracas são características dos indivíduos com condições mais hipometilados.

5.2 Correlação e dispersão entre % 5-mC e características fenotípicas

Os caracteres fenotípicos avaliados nos ramos selecionados após a poda foram submetidos juntamente com o percentual de 5-mC. Verificou-se a existência de correlação negativa significativa entre o perfil global de 5-mC e o número de flores abertas na fase de florescimento (Figura 9). Além disso, foi possível perceber que houve correlação dos genótipos em virtude do conteúdo expresso de 5-mC, bem como, a presença também de correlação presente entre a quantidade de brotos no ramo do ano formados de acordo com o conjunto de genótipos avaliados.

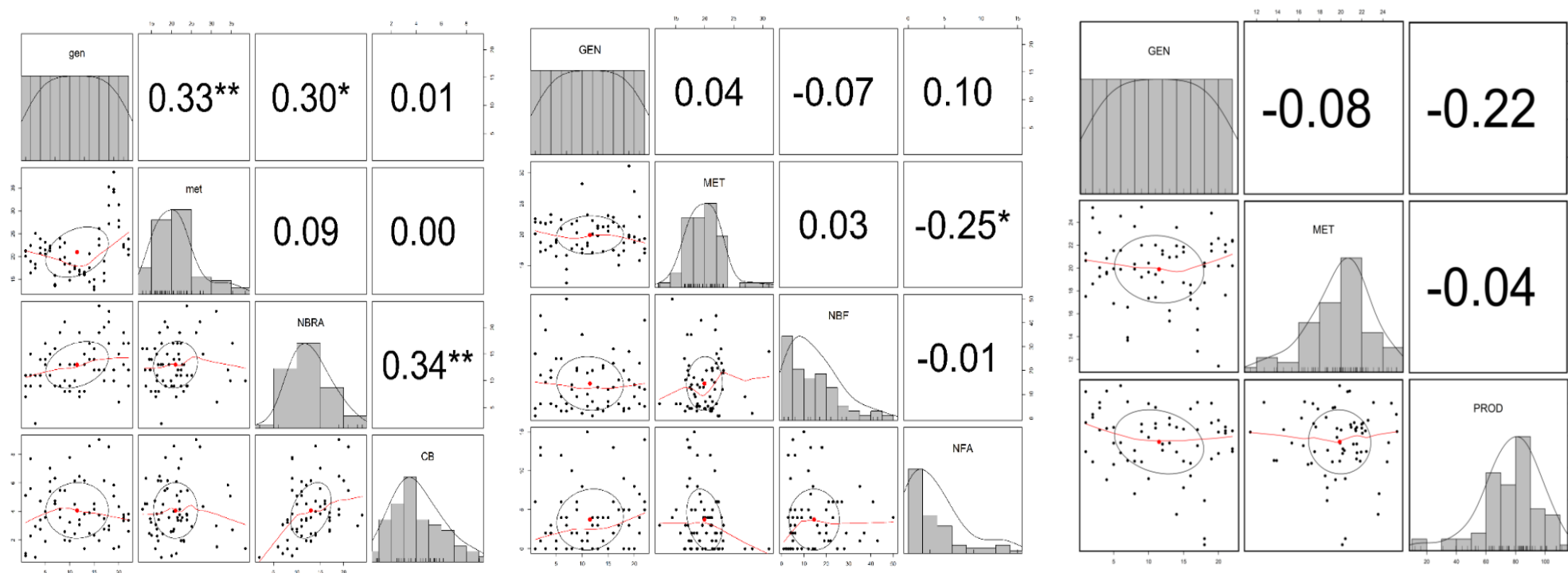


Figura 9. Correlação de Pearson com significância testado pelo método de “t” através do resultado de 5-mC com os caracteres morfoagronômicos avaliados. gen: genótipos; met: metilação; NBRA: número de brotos no ramo ao ano; CB: comprimento dos brotos; NBF: número de botão floral; NFA: número de flores abertas; PROD: produção.

Além da análise de correlação, foi possível perceber o comportamento dos genótipos, associando os caracteres morfoagrômicos com as respectivas fases de desenvolvimento por meio do conteúdo de 5-mC utilizando gráficos de dispersão (Figura 10).

O genótipo Sassaoka apresentou baixos valores de número de brotos durante a fase pós-poda; e baixo número de flores abertas no período de florescimento. Em ambos os períodos apresentou alto percentual de 5-mC. Entretanto, apresentou uma das maiores produções, com destaque também para o número de frutos.

O genótipo Roxa apresentou comportamento inverso ao de Sassaoka, embora com a segunda maior média de metilação global entre genótipos, apresentou o maior número de brotos, baixo número de botão floral e baixa produção.

Os genótipos CVII, CXIII e CXVII de menores médias de 5-mC, portanto os mais hipometilados apresentaram maiores produções.

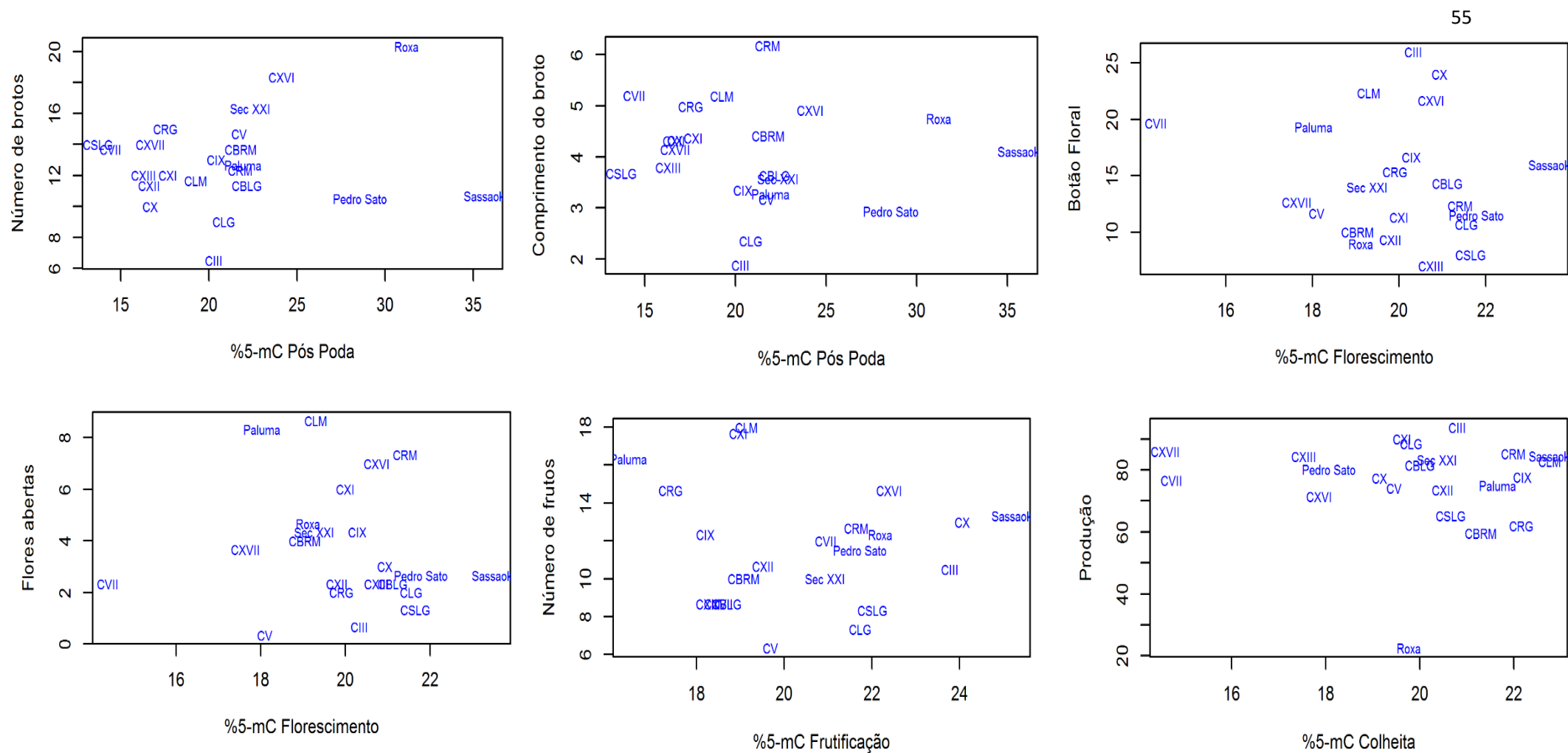


Figura 10. Dispersão gráfica de 22 genótipos de goiabeira em cada variável agrônômica dentro dos níveis de 5-mC ao longo do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da cultura.

5.3 % de 5-mC em tecidos diferenciais de goiabeira

Não houve variação estatisticamente significativa quanto à metilação global da citosina considerando diferentes órgãos vegetativos e reprodutivos (folhas jovens e desenvolvidas, galho, gema apical e botão floral) em cinco genótipos (Figura 11). O percentual de 5-mC entre os tecidos variou de 22,26% a 23,20%. Para a gema apical, folha nova e folha desenvolvida, foram encontrados 22,41%, 22,45% e 22,55% de 5-mC, respectivamente, sem diferenças significativas entre os tecidos.

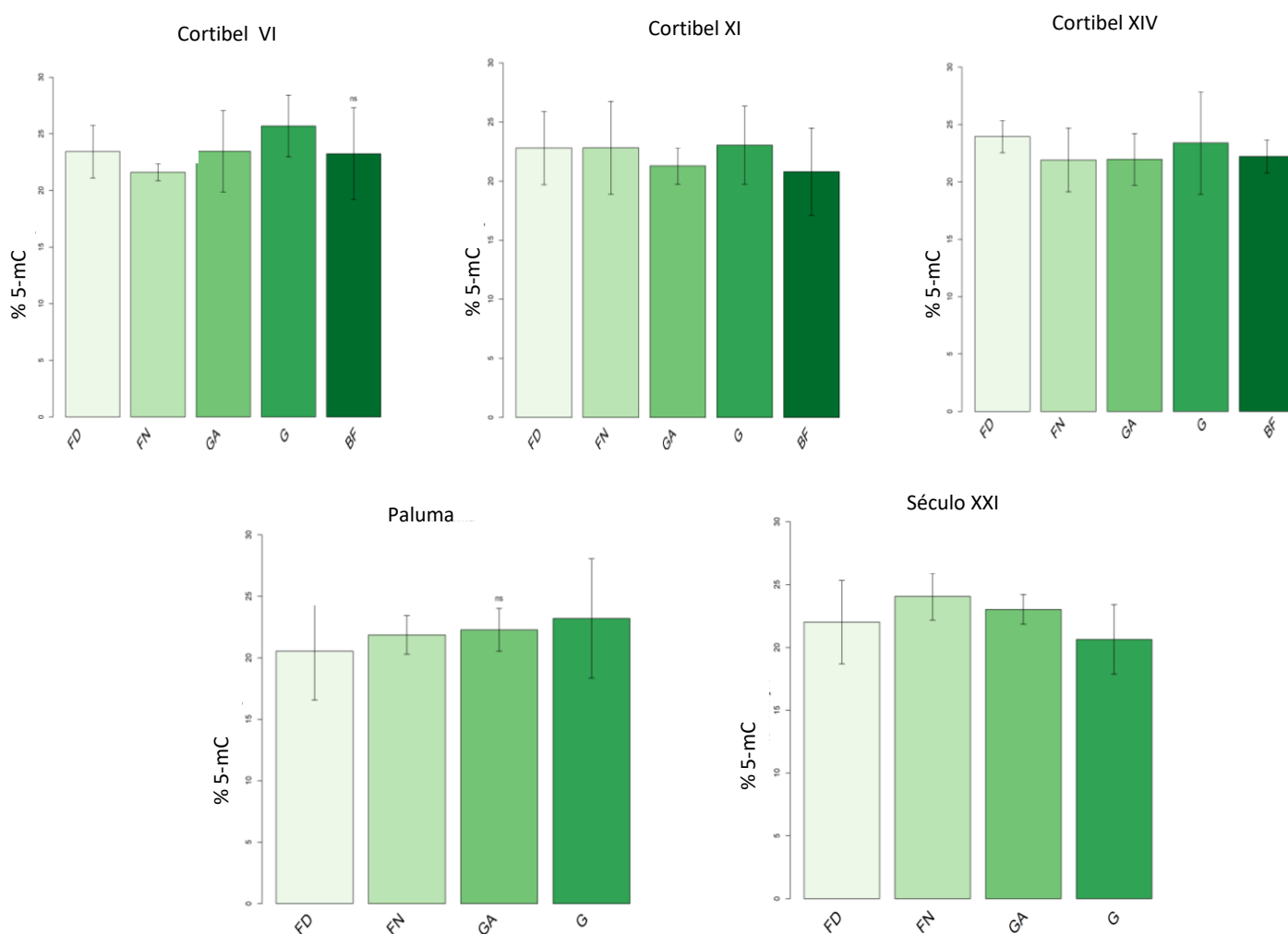


Figura 11. Percentual de 5-mC em órgãos vegetativos e reprodutivos determinado por CLAE. FD: folhas desenvolvidas; FD: folha desenvolvida; FN: folha nova; GA: gema apical; G: galho; BF: botão floral; ns: não significativo. Paluma e Século XXI não apresentaram botão floral durante a coleta realizada.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com as goiabeiras demonstram diferenças no perfil de metilação global do DNA dos genótipos avaliados ao longo do ciclo de produção. Desconsiderando o genótipo Sassaoka, de maior conteúdo de metilação global, os genótipos de maiores porcentagens de 5-mC também apresentaram diferenças em relação a características vegetativas (Figura 4).

Dentre os tratos culturais em espécies frutíferas, por exemplo, a poda configura-se um procedimento que visa a remoção de todos as brotações laterais e nos ápices, conferindo a redução na competição dos brotos por nutrientes, aumento na penetração da luz, diminuição na ocorrência de pragas e doenças, e a melhoria na produção de frutos (TUZEL, 2013). Com isso é possível uniformizar todo o desenvolvimento da planta.

De acordo com os dados da literatura uma ampla variação quanto ao conteúdo global de 5-mC foi relatada em estudo com 54 espécies de angiospermas, as quais variaram entre 5,34% (*Arabidopsis thaliana*) a 39,18% (*Narcissus buguei*). Neste estudo o conteúdo de 5-mC foi posteriormente correlacionada com o tamanho do genoma (ALONSO et al., 2015). Os resultados encontrados para goiabeiras neste estudo estão entre os valores que mais ocorreram em plantas.

Assim, considerando o tamanho do genoma, *Psidium guajava* apresenta valor $2C=0.95$ (COSER et al., 2012), e os valores globais de 5-mC nos genótipos de goiabeiras variaram entre 10,66% a 35,78%, associada as fases de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, obtendo-se para a cultura de forma geral 20,27% de metilação das citosinas. Valores de conteúdo e metilação do DNA também foram mensurados para outras espécies da mesma família botânica de Myrtaceae, como o eucaliptos em geral apresentam conteúdo de DNA $2C$ em torno de 1 (PRAÇA et al., 2009), e estudos realizados com brotações de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, relatou-se a análise em três momentos de desenvolvimento das plantas obtendo-se em relação a 5-mC os percentuais de 13,7% aos oito anos, 12,6% aos dois anos e 11,3% com mudas de 3 semanas (MANKESSI et al., 2011). Em *Myrtus communis* L. na análise para o conteúdo de metilação notou-se a presença de 11% de 5-mC disposto no genoma (PARRA et al., 2001).

Diferenças significativas no nível de 5-mC nas fases de desenvolvimento vegetativo foram relatadas em tabaco, em análises do tecido foliar pela metodologia

Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) em cinco genótipos avaliados em cinco diferentes regiões. Os maiores valores foram observadas durante o estágio de roseta (fase vegetativa), e reduzindo ao longo do desenvolvimento. O menor nível de 5-mC foi observado na fase reprodutiva de floração (ZHANG et al., 2015).

Não há relatos de perfil de 5-mC entre genótipos na mesma condição experimental em campo, como relatado neste estudo. Através desse estudo em goiabeiras é possível inferir que houve pouca influência ambiental sobre as fases de desenvolvimento e há uma maior influência do genótipo no controle epigenético relacionados às fases reprodutivas nas plantas de goiabeira. Os sinais ambientais podem ser integrados a conformação da cromatina e atuando no desenvolvimento e função do genoma do indivíduo, que por sua vez, esses sinais podem também estar presentes nas vias de sinalização hormonal na cromatina dos meristemas vegetais (BRÄUTIGAM & CROCK, 2018). As fases de pós-poda e pós-colheita foram as que tiveram as maiores diferenças entre os genótipos quanto ao nível de 5-mC. A ocorrência da poda e o estresse gerado pela colheita são reflexos desse resultado.

Considerando os resultados obtidos em goiabeiras, foi possível perceber uma variação maior no nível de 5-mC durante o período vegetativo em comparação com o período reprodutivo. Na fase pós-poda, foi o momento de maior variação dos genótipos, que vão se modificando ao longo do ciclo de produção avaliado. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre as fases de desenvolvimento da goiabeira, a partir da análise dos genótipos ao longo do ciclo de produção, verificou-se que alguns deles demonstraram diferenças significativas ao longo do desenvolvimento.

Dentre os 22 genótipos, a cultivar Sassaoka foi destaque com maior percentual de 5-mC, em especial durante o período da pós-poda. Considerando as suas características agronômicas e pontos de estudo morfoagronômicos, ela se sobressai por sua alta produtividade, elevada vida útil de frutos pós-colheita, frutos grandes e arredondados com cloração rosa-claro, casca muito rugosa, bom desempenho em ambientes favoráveis, baixa influência ambiental sob a composição química de óleos essenciais (BARBOSA & LIMA, 2010; SILVA, 2017; SOUZA et al., 2017). O mecanismo epigenético de 5-mC é transmitido para a progênie, o qual pode resultar em elemento na análise de variação quantitativa entre as variedades, possibilitando assim, novos enfoques para o melhoramento vegetal (GALLUSCI et al., 2017).

No contexto geral estatístico da 5-mC entre os genótipos, Pedro Sato e CLG não diferiram significativamente. Esses genótipos, juntamente com Sassaoka apresentam similaridades quanto ao número de brotações (SILVA, 2017). Os genótipos Roxa e CXVI foram similares quanto ao incremento do diâmetro do ramo ortotrópico e no comprimento dos brotos do ramo do ano, apresentando os maiores números de brotos nesta poda (caracterizado como poda inverno no trabalho de Silva (2017) (Sup. 2).

Os genótipos CVII, CXIII, CXVII apresentaram as menores médias de 5-mC, sugerindo que tiveram menor influência do mecanismo do controle epigenético aqui em estudo, apresentando uma condição de hipometilação dentre os demais, o que pode induzir um aumento na expressão gênica (XU et al., 2016). A análise dos tecidos foliares coletados ao mesmo tempo e estágios de desenvolvimento, possibilita perceber diferenças nos genótipos quanto ao percentual de 5-mC, retratando uma heterogeneidade atribuída a manifestação de características epigenéticas (ALONSO et al., 2014).

As diferenças apresentadas no percentual de 5-mC nos tecidos vegetais está provavelmente associada com diferentes vias de metilação presente no organismo (BARTELS et al., 2018). Entretanto os tecidos avaliados não demonstraram diferenças entre eles. Como a análise ocorreu após os genótipos estarem completamente desenvolvidos e em intensa fase de produção, pode ser um indício para que o conteúdo de 5-mC se manteve estável entre eles.

Notou-se a diferença significativa quanto a 5-mC nos genótipos, e o desdobramento realizado de cada um deles nas cinco fases de desenvolvimento da planta infere-se que uma hipótese a ser levantada a respeito do comportamento diferencial da metilação na pós-poda nesse estudo realizado com as goiabeiras, pode estar relacionada a uma resposta dos genótipos às condições ambientais imposta pelo corte dos galhos, de forma a favorecer o crescimento da brotação para o desenvolvimento vegetativo e resposta ao estresse gerado pelo trato cultural.

As variações dos genótipos nas fases de desenvolvimento vegetativos foram maiores em comparação com o período reprodutivo. Em análise realizada com amostras de tabaco provenientes de períodos de desenvolvimento distintos, notou-se a distribuição das amostras coletadas durante a fase vegetativa com comportamento mais próximos de 5-mC. Por outro lado, as amostras coletadas durante a fase reprodutiva apresentaram distribuição mais espaçada em torno da área, e com isso a

variação no teor de 5-mC nas amostras ao longo do desenvolvimento reprodutivo foram maiores que as encontradas ao longo do desenvolvimento vegetativo (ZHANG et al., 2015).

Padrão de comportamento similar em todas as fases analisadas foi verificado para os genótipos CLG, CIII, CRM e Século XXI, que foram iguais em todas as fases avaliadas. Os três primeiros também permaneceram unidos no mesmo grupo em estudos com óleos essenciais (MENDES et al., 2018; SOUZA et al., 2017).

As mudanças mais expressivas observadas no comportamento dos genótipos foram da progressão da fase vegetativa para a fase reprodutiva, e isso leva a ocorrência de padrões epigenéticos, como a 5-mC, de forma a atuar expressivamente no fenótipo da planta. Esse comportamento pode estar sendo evidenciado a partir dos resultados apresentados por Silva (2017) na análise de caracteres reprodutivos. A presença de botões florais começaram a aparecer entre 75 a 90 dias após a poda, entretanto nos genótipos CVIII, CXII, e Século XXI, foram precoces com o aparecimento aos 15 dias logo após a poda em pelo menos uma das repetições. Por outro lado, a CLM e Paluma iniciaram a emissão de botão floral aos 75 dias e a formação de frutos aos 90 dias. Esse mesmo comportamento foi evidenciado para os genótipos CV, CRM, CBRM e Pedro Sato (Sup. 3).

Padrão diferencial ao longo de avaliações também apresentaram comportamento diferentes em estudos com culturas embriogênicas de araucária (*Araucaria angustifolia*) realizado por Fraga et al. (2016), apresentando um padrão heterogêneo em ciclos de multiplicação variando entre 10.55 a 20.04% de 5-mC. Quando foram adicionados reguladores de crescimento, foi obtido comportamento diferencial entre os ciclos na faixa de 10.03 a 15.98 % 5-mC.

A alteração no perfil de 5-mC ocorrem em função de interação com as fases de desenvolvimento da planta. De acordo com Silva (2017), isso demonstra que o genótipo exerce grande papel nas fases reprodutivas e vegetativas de goiabeiras e a poda, no qual realizou-se este experimento (chamada de poda no inverno no trabalho de Silva, 2017) houve maior ciclo vegetativo e maiores números de brotos, em relação a poda realizada no verão.

O agrupamento dos genótipos, evidenciou as Cortibel X e XIII permaneceram no mesmo grupo, além disso, houve a proximidade na análise em *heatmap*, diferindo apenas nas fases de florescimento e frutificação. Essa característica foi evidenciada em estudos morfológicos e moleculares na avaliação da diversidade genética

realizado por Coser et al., (2012) e para a diversidade de goiabeiras através de dados morfológicos durante o período de desenvolvimento vegetativo (SILVA, 2017).

A transição do crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo é regulado por vias de floração que são controladas através de fatores ambientais e atuação de genes endógenos, e essa mudança de ciclos constitui um dos momentos importantes para o desenvolvimento das plantas, uma vez que a iniciação floral é essencial para a produção, refletindo no sucesso reprodutivo (YRUELA, 2015).

Houve correlação negativa entre o número de flor aberta com o percentual de 5-mC, ou seja, o aumento da 5-mC ocasionou a diminuição na quantidade de flores abertas analisadas durante o período de florescimento.

As características fenotípicas dos vegetais podem ser influenciadas pela regulação do contexto gênico induzido através da metilação do DNA e, dessa forma, a dinâmica atribuída por esse mecanismo epigenético no genoma dos organismos são de suma relevância para apresentar esse mecanismo nos processos de desenvolvimento dos vegetais e adaptações à fatores externos (ZHANG et al., 2015).

Correlações referentes às variações apresentadas no nível de 5-mC com traços ecológicos foram consideradas relevantes para reprodução em *H. foetidus*, sendo possível perceber que, à medida que o genoma era mais hipometilado elas tendiam a apresentar tamanho similar e maior capacidade de reprodução em relação àquelas mais hipermetiladas. Com o passar dos anos, essas diferenças apresentadas eram manifestadas na sobrevivência individual, na longevidade do organismo e produção de sementes (ALONSO et al., 2014). Além disso, os autores relataram significância na relação entre o percentual de 5-mC e o conjunto de frutos e massa nas sementes.

O genótipo Sassaoka pode ser um elemento de destaque no estudo de genes que podem estar atuando devido a ocorrência de 5-mC. As características fenotípicas dos vegetais podem ser influenciadas pela regulação do contexto gênico induzido através da metilação do DNA e, dessa forma, a dinâmica atribuída por esse mecanismo epigenético no genoma dos organismos são de suma relevância para apresentar esse mecanismo nos processos de desenvolvimento dos vegetais e adaptações à fatores externos (ZHANG et al., 2015).

Os mecanismos epigenéticos ocorrem durante os processos de divisões celulares, e as características associadas, como a 5-mC, tendem a passar de uma geração para outras, modificando por sua a conformação da cromatina. Não foi evidenciado variações entre os níveis de 5-mC dispostos no tecidos avaliados.

A metilação do DNA desempenha um papel maior na diferenciação entre os indivíduos em comparação com as fases de desenvolvimento. Além disso, apesar de haver muitas alterações na expressão genica e essas ocorrerem durante o desenvolvimento dos tecidos nos organismos vegetais, há poucas evidências associada a variação em tecido-especifico da 5-mC nesse processo de desenvolvimento. Em estudo realizado em milho com diferentes tecidos, notou-se poucas variações nos níveis de metilação do DNA que pudessem fornecer mecanismos regulatórios do desenvolvimento associado a expressão gênica da cultura (EICHTEN et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

A porcentagem de 5-metilcitosina global no genoma de goiabeiras é variável dependendo do genótipo.

Alguns genótipos apresentam maior estabilidade quanto a este parâmetro, não apresentando variação ao longo do ciclo de produção, enquanto outros apresentam variações significativas entre os períodos vegetativos e reprodutivos.

O genoma mais hipometilado foi verificado em genótipos no período vegetativo pós-colheita que tem proximidade genética relatada em trabalhos anteriores (CX e CXIII).

A maior variação na porcentagem global de 5-metilcitosina ocorreu no período pós-poda, o qual é caracterizado por intensa atividade vegetativa após a poda drástica para a produção de acordo com as recomendações para a cultura.

. A maior hipermetilação, detectada no genótipo Sassaoka e foi associada a comportamentos diferenciais no ciclo de produção, quanto a caracteres agronômicos, constituindo um importante sinalizador para estudos de melhoramento.

Não houve variação entre tecidos vegetativos e reprodutivos em diferentes genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

ALONSO, C.; BALAO, F.; BAZAGA, P.; PÉREZ, R. Epigenetic contribution to successful polyploidizations: variation in global cytosine methylation along an extensive ploidy series in *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). **New Phytologist**, v. 212, p. 571 – 576, 2016.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; HERRERA, C. M. Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. **Frontiers in Genetics**, v. 46, n. 4, p. 1 – 10, 2015.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. Individual variation in size and fecundity is Correlated with differences in global dna cytosine Methylation in the perennial herb *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v. 101, n. 8, p. 1309 – 1313, 2014.

ALONSO, C.; PÉREZ, R.; BAZAGA, P.; MEDRANO, M.; HERRERA, C. M. Within-plant variation in seed size and inflorescence fecundity is associated with epigenetic mosaicism in the shrub *Lavandula latifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v. 121, p. 153 – 160, 2018.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Interciência, 1. ed., 187 p, 2003.

ASHAPKIN, V. V.; KUTUEVA, L. I.; VANYUSHIN, B. F. Is the Cytosine DNA Methyltransferase Gene MET1 Regulated by DNA Methylation in Arabidopsis thaliana Plants? **Russian Journal of Genetics**, v. 47, n. 3, p. 279 – 288, 2011.

BARBOSA, F. R.; LIMA, M. F. A cultura da goiaba. **Embrapa Informação Tecnológica**. 2ed, 180p, 2010.

BAROZAI, M. Y. K.; AZIZ, A. N. Recent plant growth and stress management related significant advancements in epigenetics. In.: **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 4, p. 416 – 421, 2018.

BAULCOMBE, D. C.; DEAN, C. Epigenetic Regulation in Plant Responses to the Environment. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 9, p. 1-20, 2014.

BARTELS, A.; HAN, Q.; NAIR, P.; STACEY, L.; GAYNIER, H.; MOSLEY, M.; HUANG, Q. Q.; PEARSON, J. K.; HSIEH, T. F.; AN, Y. Q. C.; XIAO, W. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development. **International Journal Molecular Science**, v. 19, n. 7, p. 1 – 17, 2018.

BEWICK, A. J.; NIEDERHUTH, C. E.; JI, L.; ROHR, N. A.; GRIFFIN, P. T.; LEEBENS-MACK, J.; SCHMITZ, R. J. The evolution of Chromomethylases and gene body DNA methylation in plants. **Genome Biology**, v. 18, n. 65, p. 1 -13, 2017.

BRÄUTIGAM, K.; CRONK, Q. DNA Methylation and the Evolution of Developmental Complexity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1447, p. 1 – 14, 2018.

BROCKLEHURST, S.; WATSON, M.; CARR, I.M.; OUT, S.; HEIDMANN, I.; MEYER, P. Induction of epigenetic variation in Arabidopsis by over-expression of DNA METHYLTRANSFERASE1 (MET1). **Plos One**, v.13, n. 2, p. 1 – 22, 2018.

BURYANOV, Y. I.; SHEVCHUK, T. V. DNA Methyltransferases and Structural-Functional Specificity of Eukaryotic DNA Modification. **Biochemistry**, v. 70, n. 7, p. 730 – 742, 2005.

CHEN, K.; ZHAO, B. S.; HE, C. Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression. **Cell Chemical Biology**, v. 23, p. 74-85, 2016.

CHEN, Q.; TAO, S.; BI, X.; XU, X.; WANG, L.; LI, X. Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. **American Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 98 – 101, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, v. 5, 456p, 2006.

COSER, S, M.; FERREIRA, M. F, S.; FERREIRA, A.; MITRE, L. K.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Assessment of genetic diversity in Psidium guajava L. using different approaches. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 223 – 229, 2012.

COSER, S. M.; FERREIRA, M. F. S.; FERREIRA, A.; SARAIVA, S. H. Diversidade genética de seleções de goiabeiras cortibel. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 391-399, 2014.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v, 34, n. 2, p. 125 – 136, 2013.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: biometria. Editora da UFV, p. 382, 2012.

CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D., SATO, A. C. K.; VIEIRA, G. S. **Guava, in Tropical and Subtropical Fruits**: Postharvest Physiology, Processing and Packaging. 2012.

DHAR, M. K.; VISHAL, P.; SHARMA, R.; KAUL, S. Epigenetic Dynamics: Role of Epimarks and Underlying Machinery in Plants Exposed to Abiotic Stress. **International Journal of Genomics**, v. 2014, 2014.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DOU. L.; JIA, X.; WEI, H.; FAN, S.; WANG, H.; GUO, Y.; DUAN, S.; PANG, C.; YU, S. Global analysis of DNA methylation in Young (J1) and senescent (J2) *Gossypium hirsutum* L. cotyledons by MeDIP-Seq. **Plos one**, v. 12, n. 7, p. 1 – 20, 2017.

DUBIN, M. J.; PEI ZHANG, P.; MENG, D.; REMIGEREAU, M. S.; OSBORNE, E. J.; CASALE, F. P.; DREWE, P.; KAHLES, A.; JEAN, G.; VILHJÁLMSSON, B.; JAGODA, J.; IREZ, S.; VORONIN, V.; SONG, Q.; LONG, Q.; RÄTSCH, G.; STEGLE, O.; CLARK, R. M.; NORDBORG, M. DNA methylation in Arabidopsis has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. **E-life**, v. 4, p. 1-23, 2015.

EICHTEN, S. R.; BRISKINE, R.; SONG, J.; LI, Q.; SWANSON-WAGNER, R.; HERMANSON, P. J.; WATERS, A. J.; STARR, E.; WEST, P.T.; TIFFIN, P.; MYERS, C. L.; VAUGHN, M. W.; Springer, N. M. Epigenetic and Genetic Influences on DNA Methylation Variation in Maize Populations. **The Plant Cell**, v. 25, p. 2783 – 2797, 2013.

FENG, S.; COKUS, S. J.; ZHANG, X.; CHEN, P. Y.; BOSTICK, M.; GOLL, M. G.; HETZE, J.; JAIN, J.; STRAUSS, S. H.; HALPERN, M. E.; UKOMADU, C.; SADLER, K. C.; PRADHAN, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **PNAS**, v. 107, n. 19, p. 8689 – 8694, 2010.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E. Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 179 – 186, 2011.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese)**. R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; HERINGER, A. S.; PUTTKAMMER, C. C.; SILVEIRA, V.; GUERRA, M. P. DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, p. 353 – 374, 2016.

GALLUSCI, P.; DAI, Z.; GÉNARD, M.; GAUFFRETAU, A.; LEBLANC-FOURNIER, N.; RICHARD-MOLARD, C.; VILE, D.; BRUNEL-MUGUET, S. Epigenetics for plant improvement: Current Knowledge and Modeling avenues. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 610-623, 2017.

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA Methylation and Demethylation in Arabidopsis. **The Arabidopsis Book**, v. 6, p. 1 – 14, 2008.

GEORGIEVA, M.; ASHYDOV, N. M.; HAJDUCH, M. DNA damage, repair monitoring and epigenetic DNA methylation changes in seedlings of Chernobyl soybeans. **DNA repair**, v. 50, p. 14 -21, 2017.

GILL, K.S.; DHALIWAL, H.S.; MAHAJAN, B.V.C.; PALIYATH, G.; BOORA, R.S. Enhancing postharvest shelf life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda by pre-harvest application of hexanal containing aqueous formulation. **Postharvest Biol. Technol**, 2015.

GOETTEL, W.; MESSING, J. Epiallele biogenesis in maize. **Gene**, v. 516, p. 2 – 23, 2013.

GREER, E. L.; BLANCO, M. A.; GU, L.; SENDINC, E.; LIU, J.; ARISTIZÁBAL-CORRALES, D.; HSU, C. H.; ARAVIND, L.; HE, C.; SHI, Y. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. **Cell**, v. 161, n. 4, p. 868 – 878, 2015.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1 – 27, 2008.

HAMMOND, S. M.; CAUDY, A. A.; HANNON, G. J. Post-transcriptional gene silencing by doublestranded RNA. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 110 – 119, 2001.

HENIKOFF, S.; GREALLY, J. M. Epigenetics, cellular memory and gene regulation. **Current Biology**, v. 26, p. 6451 – 6458, 2016.

HORVATH, V.; MERECIANO, M.; GONZALEZ, J. Revisiting the Relationship between Transposable Elements and the Eukaryotic Stress Response. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 11, p. 832 – 841, 2017.

HUANG, J.; LYNN, J. S.; SCHULTE, L.; VENDRAMIN, S.; MCGINNIS, K. Epigenetic Control of Gene Expression in Maize. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 328, p. 25 – 48, 20172006.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>. Acesso em: 04 jun. 2018.

IWASAKI, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic memory in plants. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 18, p. 1987 – 1998, 2014.

IKEUCHI, M.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Control of plant cell differentiation by histone modification and DNA methylation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 28, p. 60 - 67, 2015.

JOHNSTON, J. W.; HARDING, K.; BREMNER, D. H.; SOUCH, G.; GREEN, J.; LYNCH, P. T.; GROUT, B.; BENSON, E. E. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 844 – 853, 2005.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature**, v. 13, p. 484 – 492, 2012.

JONES, P. A.; LIANG, G. Rethinking how DNA Methylation Patterns are Maintained. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 11, p. 805–811, 2009.

KUMAR, S. Epigenomics of Plant Responses to Environmental Stress. **Epigenomes**, v. 2, n. 6, p. 2-17, 2018.

KURDYUKOV, S.; BULLOCK, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. **Biology (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 1 – 21, 2016.

LELE, L.; NING, D.; CUIPING, P.; XIAO, G.; WEIHUA, G. Genetic and epigenetic variations associated with adaptation to heterogeneous habitat conditions in a deciduous shrub. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 2594 – 2606, 2018.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in Mammalian development. **Nature reviews genetics**, v. 3, p. 662 – 673, 2002.

LI, Q.; EICHTEN, S. R.; HERMANSON, P. J.; ZAUNBRECHER, V. M.; SONG, J.; WENDT, J.; ROSENBAUM, H.; MADZIMA, T. F.; SLOAN, A. E.; HUANG, J.; BURGESS, D. L.; RICHMOND, T. A.; MCGINNIS, K. M.; MEELEY, R. B.; DANILEVSKAYA, O. N.; VAUGHN, M. W.; KAEPLER, S. M.; JEDDELOH, J. A.; SPRINGER, N. M. Genetic Perturbation of the Maize Methylome. **Plant Cell**, v. 26, p. 4602 – 4616, 2014.

LISANTI, S.; OMAR, W. A. W.; TOMASZEWSKI, B.; DE PRINS, S. S. P.; JACOBS, G.; KOPPEN, G.; MATHERS, J. C.; LANGIE, S. A. S. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1 – 11, 2013.

LISTER, R.; O'MALLEY, R. C.; TONTI-FILIPPINI, J.; GREGORY, B. D.; BERRY, C. C.; MILLAR, H.; ECKER, J. R. Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. **Cell**, v. 133, p. 523 – 536, 2008.

LIU, J.; FENG, L.; LI, J.; HE, Z. Genetic and epigenetic control of plant heat responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 267, p. 1-21, 2015.

MANKESSI, F.; SAYA, A. R.; FAVREAU, B.; DOULBEAU, S.; CONÉJÉRO, G.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J. L.; MONTEUUIS, O. Variations of DNA methylation in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* shoot tips and apical meristems of different physiological ages. **Physiologia Plantarum**, v. 143, p. 178 – 187, 2011.

MATZKE, M. A.; MOSHER, R. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 394-408, 2014.

MENDES, L. A.; SOUZA, T. S.; MENINI, L.; GUILHEN, J. H. S.; BERNARDES, C. O.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S. Spring alterations in the chromatographic profile of leaf essential oils of improved guava genotypes in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 295 – 302, 2018.

NGOM, B.; SARR, I.; KIMATU, J.; MAMATI, E.; KANE, N. A. Genome-wide analysis of cytosine DNA methylation revealed salicylic acid promotes defense pathways over seedling development in pearl millet. **Plant Signaling & Behavior**, v. 12, n. 9, p. 1 – 7, 2017.

NIEDERHUTH, C. E.; BEWICK, A. J.; JI, L.; ALABADY, M. S.; KIM, K. D.; LI, Q.; ROHR, N. A.; RAMBANI, A.; BURKE, J. M.; UDALL, J. A.; EGESI, C.; SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J.; JACKSON, S. A.; SPRINGER, N. M.; SCHMITZ, R. J. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. **Genome Biology**, v. 17, p. 2 – 19, 2016.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L.C.; MOURA, C. S. F. T.; LIMA JÚNIOR, A. F.; ROSA, S. R. A. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 137 – 156, 2012.

PARRA, R.; PASTOR, M. T.; PÉREZ-PAYÁ, E.; AMO-MARCO, J. B. Effect of in vitro shoot multiplication and somatic embryogenesis on 5-methylcytosine content in DNA of *Myrtus communis* L. **Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 131 – 136, 2001.

PEDAPATI, A.; TIWARI, R. B.; SINGH, A. K. Effect of different osmotic pre treatments on sensory quality of osmotically dehydrated guava slices. **HortFlora Research Spectrum**, v. 3, n. 1, p. 21 – 28, 2014.

PICARD, C. L.; GEHRING, M. Proximal methylation features associated with nonrandom changes in gene body methylation. **Genome Biology**, v. 18, n. 73, p. 1-18, 2017.

PIKAARD, C. S.; SCHEID, O. M. Epigenetic Regulation in Plants. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 6, p. 3-31, 2014.

POMMER, C. V.; MURKAMI, K. R. N. Breeding guava (*Psidium guajava* L.). In: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M. (Eds.), *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. Springer, pp. 83–120, 2009.

POWLEDGE, T. M. Epigenetics and Development. **BioScience**, v. 59, n. 9, p. 736 – 741, 2009.

PRAÇA, M. M.; CARVALHO, C. R.; NOVAES, C. R. D. B. Nuclear DNA content of three Eucalyptus species estimated by flow and image cytometry. **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 524 – 531, 2009.

RATEL, D.; RAVANAT, J. L.; BERGER, F.; WION, D. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. **BioEssays**, v. 28, p. 309 – 315, 2006.

RICHARDS, C. L.; ALONSO, C.; BECKER, C.; BOSSDORF, O.; BUCHER, E.; COLOMÉ-TATCHÉ, M.; DURKA, W.; ENGELHARDT, J.; GASPAR, B.; GOGOLDÖRING, A.; GROSSE, I.; GURP, T. P. V.; HEER, K.; KRONHOLM, I.; LAMPEI, C.; LATZEL, V.; MIROUZE, M.; OPGENOORTH, L.; PAUN, O.; PROHASKA, S. J.; RENSING, S. A.; STADLER, P. F.; TRUCCHI, E.; ULLRICH, K.; VERHOEVEN, K. J. F. Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. **Ecology Letters**, v. 20, p. 1576 – 1590, 2017.

RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 745–748, 2005.

ROZHON, W.; BAUBEC, T.; MAYERHOFER, J.; SCHEID, O. M.; JONAK, C. Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.375, p. 354 – 360, 2008.

SILVA, C. A. Métodos estatísticos para estudo adaptabilidade e estabilidade fenotípica e repetibilidade em genótipos de goiabeiras. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, 90p, 2017.

SILVA, S. N. Diversidade de genótipos de goiabeiras por caracteres vegetativos e reprodutivos. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Espírito Santo, 89p, 2017.

SILVA, W. P.; AIRES, J. E. F.; CASTRO, D. S.; SILVA E SILVA, C. M. D. P.; GOMES, J. P. Numerical description of guava osmotic dehydration including shrinkage and variable effective mass diffusivity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 859 – 866, 2014.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, Freeman, p. 573, 1973.

SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 51-54, 2008.

SONG, X.; CAO, X. Context and Complexity: Analyzing Methylation in Trinucleotide Sequences. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 5, p. 351-353, 2017.

SONG, Q. X.; LU, X.; LI, Q. T.; CHEN, H.; HU, X. Y.; MA, B.; ZHANG, W. K.; CHEN, S. Y.; ZHANG, J. S. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Soybean. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 1961 – 1974, 2013.

SOUZA, T. S.; FERREIRA, M. F. S.; MENINI, L.; SOUZA, J. R. C. L.; PARREIRA, L. A.; CECON, P. R.; FERREIRA, A. Essential oil of *Psidium guajava*: Influence of genotypes and environment. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 38 – 44, 2017.

TIWARI, J. K.; SAURABH, S., CHANDEL, P.; DEVI, S.; ALI, N.; BIST, C. M.; SINGH, B. P. Analysis of Genetic and Epigenetic Changes in Potato Somatic Hybrids Between *Solanum tuberosum* and *S. etuberosum* by AFLP and MSAP Markers. **Agric Res**, v. 4, n. 4, p. 339 – 346, 2015.

TURCK, F.; COUPLAND, G. NATURAL VARIATION IN EPIGENETIC GENE REGULATION AND ITS EFFECTS ON PLANT DEVELOPMENTAL TRAITS. **Evolution**, v. 68, n. 3, p. 620 – 631, 2013.

TUZEL, Y. Cultural practices. In Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops - Principles for Mediterranean Climate Areas. FAO Plant Production and Protection Paper, p. 379 – 397, 2013.

UTHUP, T. H.; RAVINDRAN, M.; BINI, K.; THAKURDAS, S. Divergent DNA Methylation Patterns Associated with Abiotic Stress in *Hevea brasiliensis*. **Molecular Plant**, v. 4, n. 6, p. 996 – 1013, 2011.

VIDAKI, A.; DANIEL, B.; COURT, D. S. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. **Forensic Science International: Genetic**, v, 7, n. 5, p. 499–507, 2013.

WANG, L.; YUAN, J.; MA, Y.; JIAO, W.; YE, W.; YANG, D. L.; YI, C.; CHEN, Z. J. Rice Interploidy Crosses Disrupt Epigenetic Regulation, Gene Expression, and Seed Development. **MOLECULAR PLANT**, v. 11, n. 2, p. 300 – 314, 2018.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia molecular do gene**. Artmed, 7^a ed., p. 912, 2015.

WCSP - World checklist of selected plant families. Royal Botanic Gardens, Kew. Available from: <http://apps.kew.org/wcsp/>., 2016.

WILSON, P.G. Myrtaceae. *In*: K. Kubitzki (ed.). Flowering plants. Eudicots: The families and genera of vascular plants. v. 10. **Springer**, Berlin, Heidelberg, pp. 212-271.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

XIAO, Z.; WANG, C.; MO, D.; LI, J.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; CONG, P. Promoter CpG methylation status in porcine *Lyn* is associated with its expression levels. **Gene**, v. 511, p. 73-78, 2012.

XU, F.; KUO, T.; ROSLI, Y.; LIU, M. S.; WU, L.; CHEN, L. F. O.; FLETCHER, J. C.; SUNG, Z. R.; PU, L. Trithorax group proteins act together with a polycomb group protein to maintain chromatin integrity for epigenetic silencing during seed germination in *Arabidopsis*. **Molecular plant**, v. 11, p. 659 – 677, 2018.

XU, M.; HU, T.; SMITH, M. R.; POETHIG, R. S. Epigenetic Regulation of Vegetative Phase Change in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 28, p. 28 – 41, 2016.

YAISH, M. W. DNA Methylation-Associated Epigenetic Changes in Stress Tolerance of Plants. *Molecular Stress Physiology of Plants*, **Springer**, p. 427 – 440, 2013.

YRUELA, I. Plant development regulation: overview and perspectives. **Journal of plant physiology**, v. 182, p. 62-78, 2015.

ZHANG, P.Y.; WANG, J.G.; GENG, Y.P.; DAI, J.R. ZHONG, Y.; CHEN, Z.Z.; ZHU, K.; WANG, X.Z. CHEN, S.Y. MSAP-based analysis of DNA methylation diversity in tobacco exposed to different environments and at different development phases. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 62, p. 249 – 260, 2015.

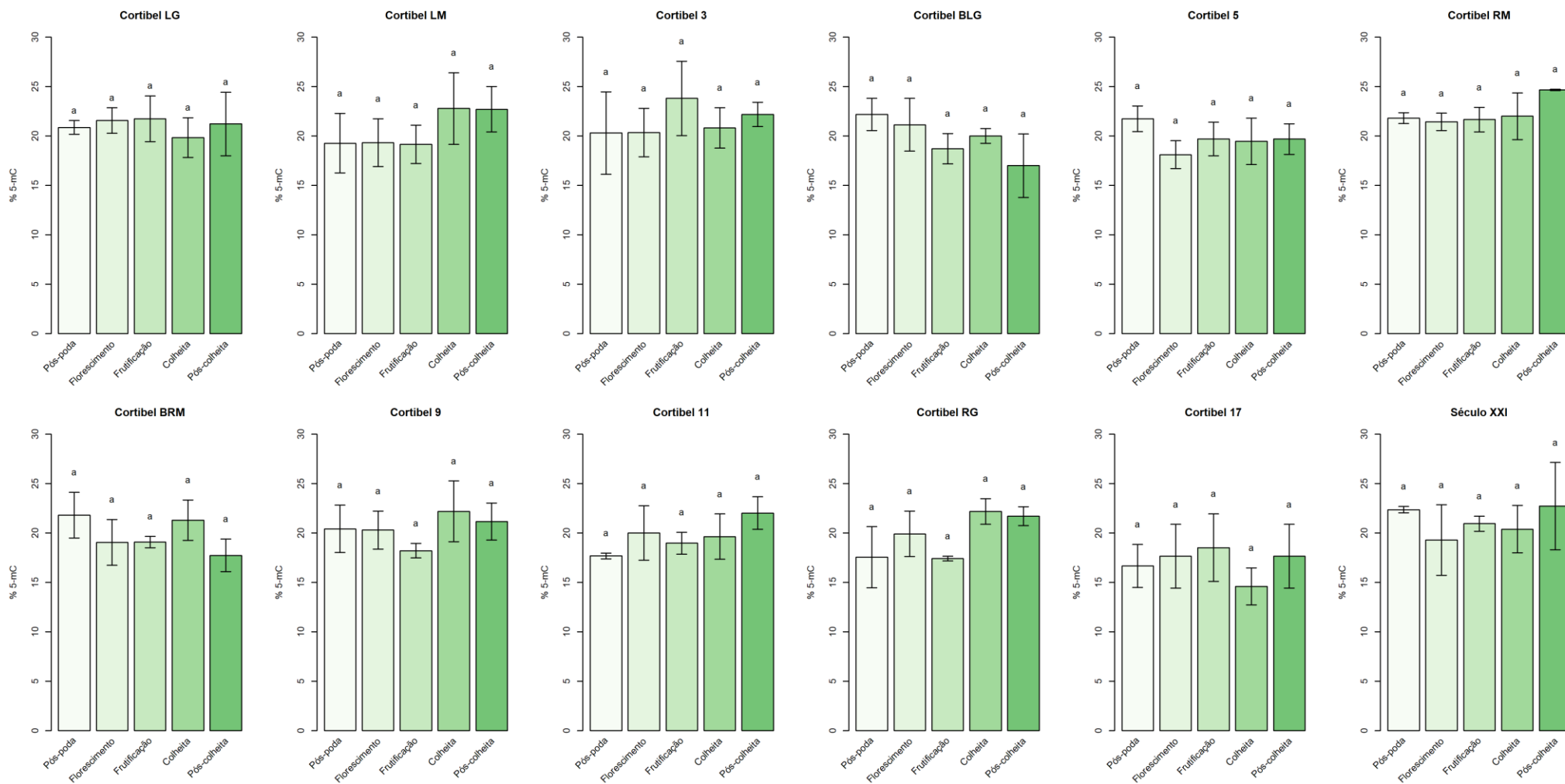
ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S. W. L.; CHEN, H.; HENDERSON, I. R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E.; ECKER, J. R. Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. **Cell**, v. 126, p. 1189 – 1201, 2006.

ZHU, J. K. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. **Annu Rev Genet**, v. 43, p. 143 – 166, 2009.

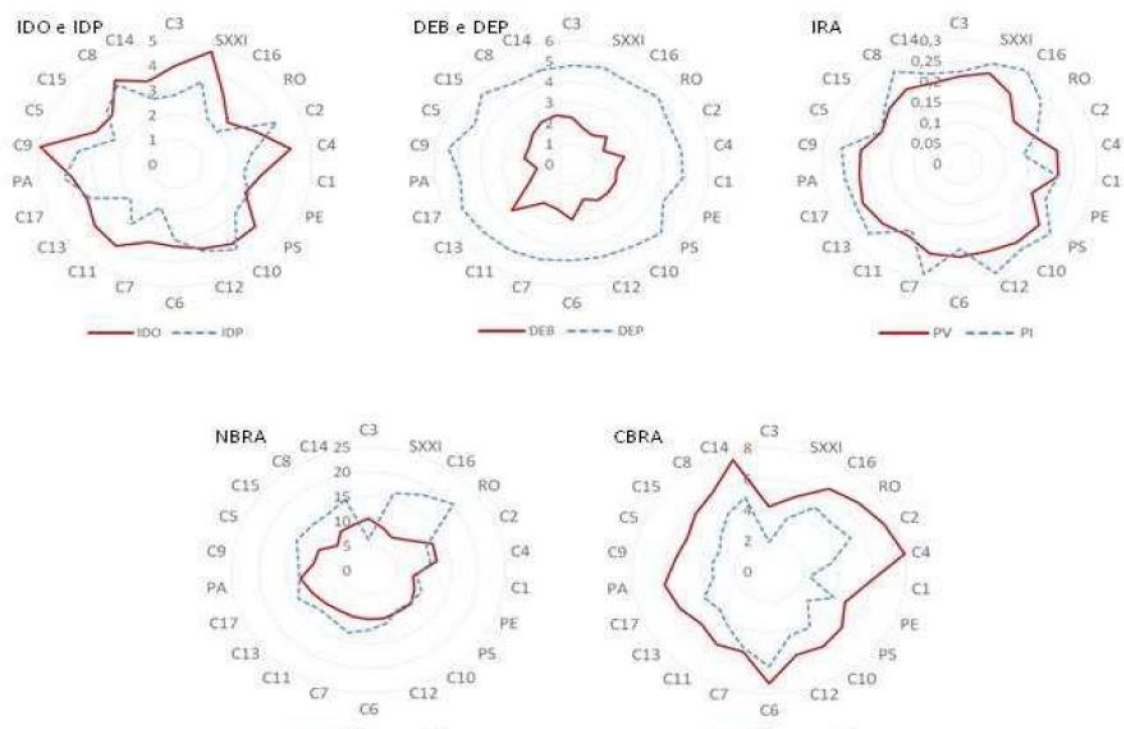
ZHU, Q. H; SHAN, W. X.; AYLIFFE, M. A.; WANG, M. B. Epigenetic Mechanisms: An Emerging Player in Plant-Microbe Interactions. **American Phytopathological Society**, v. 29, n. 3, p. 187 – 196, 2016.

Apêndices

Material Suplementar 1. Genótipos que não apresentaram interação ao com as fases de crescimento.



Material Suplementar 2. Gráfico radar com a variação no comportamento fenotípico de 22 genótipos de goiabeira observados no ciclos de produção de inverno e também de verão com caracteres na fase vegetativas: incremento do diâmetro do ramo ortotrópico (IDO) e plagiotrópicos (IDP); distância dos entrenós nos brotos (DEB) e nos ramos plagiotrópicos (DEP); incremento médio dos ramos do ano (IRA); número de brotos do ramo do ano (NBRA) e comprimento de brotos do ramo no ano (CBRA). Podas realizadas no verão (PV) e no inverno (PI). C1 = CLG, C2 = CLM, C4 = CBLG, C6 = CRM, C8 = CRRM; C14 = CRG; C15 = CSLG; RO = Roxa; PS = Pedro Sato; SXXI = Século XXI; PA = Paluma. Fonte: Silva, 2017.



Material Suplementar 3. Presença de botão floral, flor aberta e fruto em 22 genótipos de goiabeira durante o ciclo de produção com poda realizada no inverno. C1 = CLG, C2 = CLM, C4 = CBLG, C6 = CRM, C8 = CBRM; C14 = CRG; C15 = CSLG; RO = Roxa; PS = Pedro Sato; SXXI = Século XXI; PA = Paluma. Fonte: Silva, 2017.

| GEN | DIAS APÓS A PODA DE INVERNO | | | | | | | | | |
|------|-----------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 15 | 35 | 55 | 75 | 90 | 115 | 135 | 155 | 215 | |
| C1 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ✱♦ | ♦ |
| C2 | - | - | - | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ✱♦ | ♦ |
| C3 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ | ♦ |
| C4 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C5 | - | ♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦ |
| C6 | - | ♦ | ♦ | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C7 | - | ♦ | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C8 | ♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦♦ | ♦ |
| C9 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C10 | - | - | ♦ | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C11 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C12 | ♦ | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C13 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C14 | - | - | - | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C15 | - | - | ♦ | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C16 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| C17 | - | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| RO | - | - | - | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| PE | - | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| PS | - | ♦ | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| SXXI | ♦ | ♦ | - | ♦ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |
| PA | - | - | - | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦✱ | ♦ |

♦ Botão floral ✱ Flor aberta ♦ Fruto

PRESEÇA DA VARIÁVEL NAS TRÊS PLANTAS DO BLOCO

♦ Botão floral ✱ Flor aberta ♦ Fruto

PRESEÇA DA VARIÁVEL EM 1/3 DAS PLANTAS DO BLOCO

♦ Botão floral ✱ Flor aberta ♦ Fruto

PRESEÇA DA VARIÁVEL EM 2/3 DAS PLANTAS DO BLOCO