

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VINICIUS SARTORI FIORESI

Identificação e caracterização da família de genes SnRKs em *Psidium*
guajava: perspectivas para a tolerância ao estresse salino

ALEGRE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

VINICIUS SARTORI FIORESI

Identificação e Caracterização da família de Genes SnRKs em *Psidium guajava*: perspectivas para a tolerância ao estresse salino

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte da exigência para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Flores da Silva Ferreira

Coorientadora: Dr^a. Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira

ALEGRE

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S251i Sartori Fioresi, Vinicius, 1995-
Identificação e caracterização da família de genes SnRKs em Psidium guajava: perspectivas para a tolerância ao estresse salino / Vinicius Sartori Fioresi. - 2021.
74 f. : il.

Orientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadora: Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Goiabeira. 2. Genômica. 3. Estresse. I. Flores da Silva Ferreira, Marcia. II. de Avelar Carpinetti-Oliveira, Paola. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

VINICIUS SARTORI FIORESI

Identificação e Caracterização da família de Genes SnRKs em *Psidium guajava*: perspectivas para a tolerância ao estresse salino

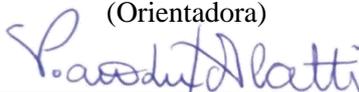
Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte da exigência para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Alegre -ES, 24 de fevereiro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA:



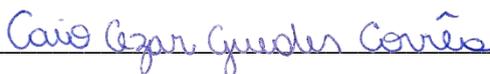
Prof^a. Dr^a. Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)



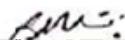
Dr^a. Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo
(Coorientadora)



Prof. Dr. Adésio Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador Interno ao Programa)



Dr. Caio César Guedes Corrêa
Universidade Federal do Espírito Santo
(Examinador externo ao Programa)



Dr. Bruno Paes de Melo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinador externo ao Programa)

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade cursar o Mestrado em Agronomia; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), que forneceram apoio financeiro para realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Agradeço a Deus, pelo conforto nas horas de dificuldade;

A minha orientadora Prof.^a Dr^a Marcia Flores da Silva Ferreira agradeço pela confiança e oportunidade de orientação, pela contribuição para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal, meu eterno carinho e admiração;

A minha coorientadora Dr^a. Paola de Avelar Carpinetti-Oliveira pelos ensinamentos, dedicação e paciência no auxílio na execução desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Adésio Ferreira, e ao Dr. Otavio Jose Bernardes Brustolini pelo suporte nas análises de bioinformática e pelos conhecimentos passados.

Ao Dr. Caio Corrêa pela ajuda e suporte nas realizações das análises de transcriptoma, e ao Dr. Pedro Henrique Dias Santos nas análises de filogenia.

Aos meus pais, Valentim e Edineia, que fizeram de tudo para que pusesse dar o meu melhor, e com toda as dificuldades sempre me apoiaram, e me ouviram, em todos os momentos durante a graduação e a pós-graduação, agradeço também a minha irmã Natana, pela ajuda e disposição durante todos esses anos dedicados à minha formação;

A minha eterna república Júlia, Daniela e Dayana e Luiza vocês fizeram o meu dia muito mais feliz durante longos anos, obrigado pelo apoio sempre;

Aos membros do Laboratório de Genética e Melhoramento e do Laboratório de Biometria Vegetal pela companhia, aprendizado e amizade! Agradeço a todos, em especial aos que pude trabalhar diretamente nesse projeto: Francine, Jônatas, Diego, Iasmine, vocês foram essenciais para a realização deste trabalho seriei eternamente grato pela amizade de vocês.

Aos meus amigos Guilherme, Helaine, Igor, Mayara pelo apoio e incentivo incondicional, me apoiando em todas as situações sejam elas tristes e felizes, com toda certeza me fizeram chegar aqui. Agradeço a tantos outros amigos que fizeram parte durante esses dois anos, vocês também fazem parte dessa conquista.

Muito obrigado

RESUMO

A salinidade é um dos grandes problemas a ser enfrentado na agricultura atualmente, tem provocado perdas consideráveis em todo mundo, principalmente lesando culturas em regiões áridas e semi-áridas, com alto processo de evaporação da água superficial do solo, fato que agrava ainda mais este processo. Outros fatores também podem ampliar a salinização dessas áreas como a baixa precipitação, depleção das águas subterrâneas, além de inadequadas práticas agrícolas. A goiabeira, *Psidium guajava* L., é amplamente cultivada em regiões áridas e semiáridas. No Brasil, a região nordeste é listada como a maior produtora do país, sendo assim evidente que o melhoramento da espécie para essa condição é valioso. Em plantas, a família de genes cinase SnRKs (subdividida em três subfamílias SnRK1, SnRK2 e SnRK3) é conhecida pela participação em diversas vias de resposta e adaptação ao estresse abiótico, incluindo sinalização por ácido abscísico (*abscisic acid* – ABA), e sinalização por espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), regulação da homeostase iônica e o estresse oxidativo, sendo amplamente indicadas como responsivos para a tolerância ao estresse salino. Inicialmente foram realizadas análises visando identificar e caracterizar sequências de genes da família dos SnRKs no genoma de referência da espécie, e no *draft* de construído de duas cultivares brasileiras Cortibel RM e Paluma no total foram identificados 53 genes nos dois genomas, onde 16 foram compartilhados, 10 exclusivos no genoma de referência e 27 exclusivos no *draft*. Dos quais 2 foram classificados como da subfamília SnRK1, 38 da SnRK2 e 13 da SnRK3. Análises de estrutura genica revelaram de 7 e 8 éxons para os genes SnRK1, de 3 a 26 éxons para os genes SnRk2 e de 1 a 15 éxons para os SnRK3. Investigações dos motivos conservados, mostraram uma variação grande entre os grupos e os estudos de expressão gênica, mostraram uma possível diferença de expressão entre as cultivares com Cortibel RM com variações tecido específico de genes expressos quanto a subfamília. Adicionalmente, em análise experimental verificou-se adequação do sistema de hidroponia, porém sendo necessário o uso de mudas com o mesmo estágio de desenvolvimento. Os demais estudos indicaram que o RNA extraído possui qualidade para estudos de biologia molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA- Ácido abscísico;

BLAST- Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local;

CIPK - Proteína quinases de interação;

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio;

FDR - False Discovery Rate;

GSDS- Gene Structure Display Server;

LiCl – Cloreto de Lítio;

MAPK - Proteína quinase ativada por miogênico;

MEME - Maximização de Múltipla Expectativa para Elicitação de Motivos;

RNA – Ácido ribonucleico;

RNAseq- Sequenciamento de ácido ribonucleico;

ROS- Espécies reativas de oxigênio;

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal;

SnRK - Proteína quinase relacionadas à sacarose não fermentadas;

SOS - Caminho extremamente sensível ao sal;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de Venn mostrando o compartilhamento dos genes SnRKs pelo genoma de referência e pelo draft das cultivares brasileiras 32
- Figura 2:** Estruturas gênicas dos genes SnRK em *P. guajava*. Os éxons são indicados pelas estruturas em roxo as linhas cinzentas conectando dois éxons representam íntrons. 33
- Figura 3.** Motivos conservados de genes SnRK em *P. guajava*. Distribuição dos 20 motivos conservados na Genes PgSnRK após análise MEME. As caixas com cores diferentes representam motivos diferentes, na parte superior da figura representa a posição de cada motivo em cada sequência de PgSnRKs. Na parte inferior, são as sequências de resíduos de aminoácidos que constitui os motivos conservados identificados nos genes PgSnRK..... 34
- Figura 4:** Localização cromossômica dos genes SnRKs, com base nos dados no genoma de referência de *Psidium guajava*, genótipo New Age..... 35
- Figura 5:** Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRKs obtidas pelo genoma de referência de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 29 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança. 36
- Figura 6.** Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRKs obtidas pelo *draft* do genoma de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 37 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança. 37
- Figura 7:** Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRK obtidas pelo genoma de referência e o *draft* do genoma de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 56 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança..... 38

Figura 8: Análise de componentes principais (PCA) dos genes SnRKs contendo duas réplicas biológicas de diferentes tecidos, botão floral, broto, folha jovem, folha madura, de duas cultivares Cortibel RM e Paluma.	39
Figura 9: <i>Heatmap</i> da abundância relativa para cada gene PgSnRk em agrupamento hierárquico para os genes de diferentes bibliotecas dos genótipos Cortibel e Paluma. O sequenciamento de RNA foi realizado em duplicata a partir diferentes tecidos de dois genótipos de <i>Psidium guajava</i> . Esse heatmap descreve a abundância relativas de sequências de genes atribuídas a cada tecido de cada cultivar (eixo y) em relação a cada gene PgSnRK identificado (eixo x). As cores do mapa de calor representam a abundância relativa, utilizando os valores de <i>reads counts</i> dos genes dentro de cada amostra, sendo a cor roxa os de maior abundância	40
Figura 10. <i>Heatmap</i> dos transcritos diferencialmente expressos para cada tecido. Cada amostra é resultado da média entre as duplicatas biológicas. Esse heatmap descreve o agrupamento entre os perfis de expressão diferencial, nos quais foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com variação de expressão superior a 1,5 (<i>fold-change</i>) entre amostras, com significância estatística (<i>p-value</i>) menor que 0,05%. Em azul representa genes com expressão diferencial para a cultivar Cortibel RM, enquanto a cor marrom é referente a genes com maior expressão na cultivar Paluma.....	42
Figura 11: <i>Heatmap</i> dos genótipos de goiabeiras e polimorfismos de genes de SnRKs amostrados. Representação na cor verde = homocigoto do alelo de referência; cor laranja = homocigoto do SNP; cor azul = heterocigoto, cor cinza = ausência da STAG na representação genômica.....	43
Figura 12: Visão geral do experimento em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado. A e B genótipos distribuídos em fileiras, totalizando seis repetições por genótipo. C e D distribuição total do experimento com controle negativo e tratamentos com 100 mM e 200mM de NaCl.	50
Figura 14: Observação das cultivares Cortibel RM, Cortibel RG, Paluma e Cortibel LG, 1 – 4 respectivamente, após 14 dias de exposição a concentração de 100mM de NaCl e 10 dias de recuperação, nota-se que a cultivar LG foi a mais afetada pela salinidade, com perda total das folhas. Os ínvios mostrados de 5 – 8 são as cultivares Cortibel RM, Cortibel RG, Paluma e Cortibel LG pertencentes ao controle, sem adição de NaCl.	53
Figura 15: Integridade de RNA extraídos de folhas das cultivares Paluma. Cortibel LG, Cortibel RG e Cortibel RM submetidas a estresse por sal, em gel formaldeído-agarose (1%) de integridade. A – Plantas controle 0mM de NaCl. B- Plantas submetidas a 100mM	

de NaCl. C- Plantas submetidas a 200mM de NaCl. Estão representas 6 réplicas por cultivar em todos os tratamentos. 54

Figura 16: Verificação de qualidade do cDNA de Amostras extraídas por amplificação do gene histona H2A usando SYBR® Green RTq-PCR e curva de fusão mostrando produtos de amplificação específicos. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de genes SnRK identificados no genoma de referência de <i>Psidium guajava</i> , genótipo New Age (genes com a inicial ctg) e no draft das cultivares brasileiras (genes com a inicial g) (*correspondem a genes similares encontrados em ambos os genomas).....	30
Tabela 2: Características dos genótipos estudados obtidos em estudos prévios do grupo de pesquisa da UFES.	49
Tabela 3: Análise de rendimento e pureza de RNA para folhas estressadas por diferentes concentrações de solução de NaCl de diferentes genótipos de P. guajava.....	55

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1: Tabela de motivos de aminoácidos conservados e anotação de PgSnRKs: A tabela mostra a número dos motivos conservados identificados após análise MEME, com tamanhos de aminoácidos para cada motivo e anotação funcional obtidos no banco de dados Pfam.	70
Apêndice 2: Sequencias de aminoácidos dos domínios conservados identificados após análise MEME.	70
Apêndice 3: Eficiência de primer: Para a análise de eficiência do primer Histona H2A, foi construída curva padrão com quantidades de cDNA de 50 ng (mais alta), 25 ng, 2,5 ng, 0,25 ng e 0,025 ng (mais baixa). A eficiência foi de 98%.	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL:	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 <i>Psidium guajava</i> L.....	15
3.2 Estresse Salino em Plantas.....	17
3.3 A família de genes SnRKs	21
4. CAPITULO I: A FAMÍLIA DE GENES SnRKs EM <i>Psidium guajava</i> : PERSPECTIVAS PARA TOLERANCIA AO ESTRESSE SALINO.....	24
4.1. Introdução:	24
4.2. Material e Métodos	26
4.2.1. Anotação de genes SnRKs no genoma de <i>Psidium guajava</i>	26
4.2.2. Análise filogenética SnRKs	27
4.2.3. Análise estrutural: identificação de motivos e estruturas gênicas.....	27
4.2.4. Análise de expressão gênica dos genes SnRKs em diferentes tecidos das cultivares brasileiras.....	28
4.2.5. Análise variabilidade genética de germoplasma de goiabeiras, por SNPs detectados em genes SnRKs.....	29
4.3. Resultados.....	29
4.4. Discussão	43
4.5. Conclusão.....	46
5. CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTO PARA ESTRESSE SALINO EM GOIABEIRA.....	47
5.1 Introdução	47
5.2 Metodologia	48
5.2.1. Material vegetal.....	48

5.2.2. Experimento de Estresse Salino	49
5.2.3. Obtenção do RNA Total e Parâmetros de Qualidade.....	50
5.2.4. Síntese de cDNA:	51
5.2.5. Amplificação por RTq-PCR:.....	52
5.3. Resultados	52
5.4. Discussão	56
5.5. Conclusão.....	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
9. APÊNDICE	70

1. INTRODUÇÃO GERAL:

Psidium guajava L., a goiabeira, é a espécie de maior importância econômica do gênero *Psidium* (Myrtaceae) (MANI; MISHRA; THOMAS, 2011). Atualmente é cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo para produção de frutos. Os maiores produtores de goiaba são Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Indonésia e Brasil, respectivamente (FAO, 2020). A fruta é proeminente na dieta tanto em *in natura* como em sucos ou geleias (EVANGELISTA; VIEITES, 2006), sendo rica em nutrientes e elementos funcionais, como antioxidantes, vitamina C, potássio e fibras (NASEER et al., 2018). A espécie também é amplamente utilizada para fins medicinais por suas propriedades cicatrizantes, antialérgicas, antidiabéticas, antidiarreicas, antineoplásicas, antiinflamatórias e antimicrobianas (BONTEMPO et al., 2012; CHOI et al., 2012; DUTTA; DAS, 2010; LINS et al., 2014; TELLA; MASOLA; MUKARATIRWA, 2019).

Psidium guajava é amplamente distribuída no globo, podendo ser cultivada com sucesso em solos negligenciados, devido sua adaptabilidade e capacidade de dispersão (URQUÍA et al., 2019). Por esse motivo também foi designada como 'a maçã dos trópicos' ou 'pobre fruto do homem' (NAKASONE and PAULL, 1998; Singh, 2007). A espécie adapta-se em diferentes ambientes com potencial tolerância a diferentes estresses bióticos e abióticos. Isso evidencia o aumento da aptidão da espécie para programas de melhoramento, um fator importante para sua ecologia e demonstrando potencial de uso em programas de melhoramento para produção e qualidade de frutos (SCHLICHTING 1986; CAÑO et al. 2008).

Por se tratar de uma espécie amplamente cultivadas em regiões áridas e semiáridas, a goiabeira é afetada por estresses abióticos, como o estresse salino. Essa condição provoca perdas consideráveis na produção, por afetar severamente o desenvolvimento das plantas. Diversos fatores são agravantes para essas condições de estresse, como o alto processo de evaporação da água superficial do solo, a baixa precipitação, a evaporação elevada das águas superficiais, depleção das águas subterrâneas e inadequadas práticas agrícolas (CHAND et al., 2019). Este tipo de estresse é um fator ambiental limitante da produtividade agrícola (ASHRAF; HARRIS, 2004) e é

definido como a situação de excesso de sais solúveis, sódio trocável ou ambos, em horizontes ou camada superficiais do solo, afetando o desenvolvimento vegetal (RIBEIRO et al., 2009). Diante disso, o conhecimento da reação de diferentes genótipos de goiabeiras em condições desfavoráveis e a identificação de fatores genéticos relacionados a tolerância ao estresse salino, são valiosos no desenvolvimento de cultivares tolerantes ao estresse.

Para a tolerância ao estresse salino, as plantas coordenam uma complexa via de sinalização, que incluem sensores de reconhecimento de estresse, proteínas, transdutores de sinalização, fatores de transcrição, genes e metabolismo responsivo ao estresse, resultante de vários mecanismos dependentes de interações morfológicas, fisiológicas e moleculares. Além de resposta complexa de estratégias adaptativas como regulação hormonal, alteração redox e controle epigenético de genes relacionados ao estresse (ZHU, 2016).

As plantas desenvolvem vários mecanismos de defesa moleculares para lidar com estresses, sendo a regulação da expressão gênica e a modificação de proteínas de extrema importância para a tolerância (BOHNERT et al., 2006). Os processos de fosforilação e desfosforilação mediados por proteínas cinase desempenha papel crucial na modificação de proteínas (HUNTER, 1995). Entre os genes envolvidos em diferentes processos fisiológicos relacionados a tolerância a estresses abióticos em plantas estão os de proteína cinase relacionadas à sacarose não fermentadas (SnRKs - *sucrose non-fermenting 1-related protein kinases*) (HRABAK et al., 2003). As proteínas cinases constituem importantes reguladores nas plantas, pois estão envolvidas na detecção de sinais ambientais por meio de proteínas receptoras de membrana que por sua vez ativam diferentes proteínas ligadas as vias de fosforilação, que regulam a expressão de genes resistentes ao estresse a jusante (CAKMAK et al., 2012). A família de genes SnRKs está relacionada a diversas vias responsivas ao estresse salino, como a via de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) e ácido abscísico (*abscisic acid* – ABA) e a via SOS (*Salt Overly Sensitive pathway*), exclusiva de respostas provocadas pela salinidade (XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002).

A família de genes SnRKs são participantes importantes de diversas vias que respondem ao estresse salino em plantas como é descrito em diferentes culturas de interesse agrônomico como Soja, Milho, Algodão, Eucalipto. Genes SnRK2.3 e SnRK6.6 descritos em *Zea mays*, foram fortemente induzidos em estresse por NaCl (HUAI et al.,

2008). Em *Eucalyptus grandis* genes como EgrSnRK2.2, EgrSnRK2.4, EgrSnRK2.5, EgrSnRK3.2, EgrSnRK3.3, EgrSnRK3.5 e EgrSnRK3.18 foram fortemente induzidos nas folhas e raiz em estresse por NaCl (WANG et al., 2019), mostrando o quanto a família de genes é importantes nas vias de respostas para a tolerância ao estresse por salinidade. A cultura da goiabeira é difundida em regiões sabiamente afetadas por altos processos de salinização dos solos, porém os estudos sobre a tolerância dessa espécie em ambientes desse tipo são incipientes, dessa forma conhecer genes que atuam nesses diferentes mecanismos de resposta ao estresse salino podem ajudar os programas de melhoramento dessa espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Gerar subsídios para o conhecimento de genes e mecanismos moleculares envolvidos nas respostas ao estresse salino em goiabeira

2.2. Objetivos Específicos

- Anotar e caracterizar estrutural e filogeneticamente a família de genes SnRks em goiabeira e estudar aspectos de genômica, transcriptômica e de SNPs nestes genes em germoplasma brasileiro.
- Gerar informações sobre respostas morfológicas e moleculares para goiabeiras com diferentes níveis de tolerância e sensibilidade ao estresse salino visando padronizar experimentos para esse tipo de estresse em diferentes cultivares.

3. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Psidium guajava* L.

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) pertence ao gênero *Psidium* da família Myrtaceae, ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais do globo (MANI; MISHRA; THOMAS, 2011). A cultura da goiabeira é de alta rentabilidade e capacidade

de geração de empregos, permitindo agregar valor comercial nos seus produtos, o que é importante para a sustentabilidade do meio rural. A frutífera pode florescer e frutificar em diferentes épocas do ano dependendo das condições climáticas e do manejo, permitindo a programação das colheitas ao longo do ano (RAMOS et al., 2010; SERRANO et al., 2007).

No Brasil, a produção de goiaba para consumo *in natura* teve impulso no início da década de 70, principalmente com os fruticultores familiares de origem japonesa, nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, com a implantação do cultivo em pequenas áreas (WATANABE, 2009). Em 2018 cerca de 21.579 hectares foram destinados à cultura de goiabeira no Brasil, com uma produção de 578.608 toneladas de goiaba. A goiabeira é cultivada em todas as regiões brasileiras, mas a produção de goiabas é mais expressiva nos estados de Pernambuco, São Paulo, Bahia, Paraná e Ceará, com 200.042, 195.406, 61.936, 23.555, 18.280 toneladas ao ano, respectivamente (IBGE, 2018). A produtividade é também liderada pelos estados Pernambuco e São Paulo, seguidos por Paraná, Distrito Federal e Bahia, com 40.024, 29.455, 27.679, 27.523 e 26.189 quilogramas por hectare respectivamente (IBGE, 2018). No Espírito Santo, a cultura da goiabeira para fins comerciais iniciou-se na década de 90 nos municípios de Santa Teresa e São Roque do Canaã (COSTA; PACOVA, 2003). Em 2018, o estado possuía uma área plantada de 473 hectares, com uma produção média de 9.226 toneladas anuais (IBGE, 2018).

A espécie, *P. guajava*, em múltiplas avaliações tem apresentado um genoma estável diploide ($2C = 0.95$ picogramas, $2n = 2x = 22$ cromossomos) (TULER et al., 2019) e conteúdo de DNA estimado de 465 Mb por citometria de fluxo (MARQUES et al., 2016). No Genbank (SAYERS et al., 2019) há um genoma com 386 Mb da espécie depositado (dados não publicados) e o cloroplasto de 158.841 bases caracterizado estruturalmente (JO et al., 2016). Recentemente o genoma da espécie foi publicado com 443.8 Mb relatando a presença de 25.601 genes (FENG et al., 2020). Dados de transcriptoma da espécie também foram descritos consistindo em 84.206 genes compreendendo 279.792 transcrições totais com um N50 de 3603 bp. Blast2GO atribuiu anotação a 116.629 transcrições e Pfam perfil HMM baseado em anotações de 140.061 transcritos com domínios de proteína (MITTAL et al., 2020). Outros dados de transcriptoma estão disponibilizados (BioProject: PRJNA472130), mas não publicado depositado no SRA (LEINONEN; SUGAWARA; SHUMWAY, 2011). CANAL (2019) proveu um estudo a respeito da genômica da espécie. Estudo proveniente de dados de

transcriptoma da espécie também foi publicado como forma de análises de grupos gênicos específicos, relacionados a síntese de ácido ascórbico (FENG et al., 2020).

Considerando estudos genômicos, *Psidium guajava* é uma espécie que tem muito a ser explorado de forma inovadora e como modelo, por se tratar de cultura perene e pertencer a uma grande família de plantas lenhosas dicotiledôneas, a família Myrtaceae. A espécie de maior quantidade de informações ômicas disponíveis é *Eucalyptus grandis*, por se tratar de uma espécie de grande importância econômica, que teve o seu genoma publicado em 2014 (MYBURG et al., 2014) e foi utilizado como referência para outras espécies na família. Posteriormente, foi publicado o genoma de *Metrosideros polymorpha*, uma espécie altamente polimórfica, endêmica do Havaí (IZUNO et al., 2016) e os outros como *Corymbia*, *Leptospermum* (THRIMAWITHANA et al., 2019). Em decorrência da publicação do genoma de *E. grandis* estudos relativos às famílias gênicas foram publicados como: genes de resistência de tolerância (CHRISTIE et al., 2016), da biossíntese de terpenos, da síntese de ligninas, bem como também foi demonstrado uma grande quantidade de duplicações *in tandem* e de segmento de famílias multigênicas (LI et al., 2018; CHRISTIE et al., 2016). Informações relevantes para o estudo de outras espécies na família como *P. guajava*.

Recentemente uma anotação estrutural do genoma de goiabeira foi publicado tendo como base a cultivar “New Age” (FENG et al., 2020), outras duas cultivares importantes e contrastantes no Brasil, Paluma e Cortibel RM, tiveram seus genomas sequenciados e o draft obtido e a anotação estrutural e funcional realizada, bem como a família de genes de biossíntese de terpenos caracterizada. Atualmente um banco de dados está sendo preparado para disponibilização pública desses dados, estudos acerca do transcriptoma por RNAseq de diferentes tecidos dessas cultivares também estão em processo finais de estruturação, o que pode permitir grandes avanços da caracterização genética da espécie (CANAL, 2018; FERNANDES, 2020).

3.2 Estresse Salino em Plantas

A salinidade tem provocado perdas consideráveis na agricultura em todo mundo, afetando severamente o desenvolvimento das plantas, lesando principalmente terras cultivadas e irrigadas em regiões áridas e semi-áridas que possuem alto processo de

evaporação da água superficial do solo. Um dos fatores mais agravantes que levam a salinidade incluem a baixa precipitação, a evaporação elevada das águas superficiais, depleção das águas subterrâneas, além de inadequadas práticas agrícolas. Estima-se que nos próximos 25 anos cerca de 30% da área cultivada no mundo esteja afetada pela salinidade (CHAND et al., 2019).

O excesso de sais solúveis no solo é decorrência de uma combinação de fatores que podem ser climáticos, devido ou baixo índice pluviométrico e elevada taxa de evapotranspiração; ou edáficos, devido à baixa capacidade de lixiviação dos sais e presença de camadas impermeáveis e de manejo do solo que estão ligados a irrigação com águas salinizadas e ao uso excessivo de agroquímicos (GHAFOR et al., 2004; QADIR; OSTER, 2004; RIBEIRO, 2010).

Dentre os estresses abióticos em plantas, a salinidade apresenta grande destaque por trazer prejuízos às propriedades físicas e químicas do solo, provoca a redução generalizada do crescimento das plantas cultivadas, acarretando em sérios danos à atividade agrícola (CAVALCANTE et al., 2010). A alta concentração de sódio (Na^+) de um solo pode prejudicar diretamente as plantas além de degradar a estrutura do mesmo, diminuindo a porosidade e a permeabilidade à água (TAIZ et al., 2017). O aumento das concentrações de sais e sódio trocável, ocasiona a redução da fertilidade do solo e, a longo prazo, pode levar a desertificação (D'ALMEIDA et al., 2005).

A salinidade exerce efeitos de forma direta ou indireta, lenta ou brusca, total ou parcial sobre o desenvolvimento e produção das culturas. A alta salinidade nas plantas afeta as plantas de várias maneiras: estresse por seca, toxicidade iônica, desbalanço nutricional, estresse oxidativo, alterações de processos metabólicos, desorganização de membrana e redução da divisão e expansão celular (MUSCOLO et al., 2007, 2013). O efeito da salinidade sobre as plantas é consequência de dois componentes do estresse salino: (1) o componente osmótico, resultante da elevada concentração de solutos na solução do solo, provocando um déficit hídrico pela redução do potencial osmótico; (2) o componente iônico, decorrente dos elevados teores de Na^+ e Cl^- , e da alterada relação K^+/Na^+ e outros nutrientes (MUNNS, 1993).

A salinidade pode afetar as plantas em duas fases, a primeira, o crescimento da planta é afetado pelos sais que estão no exterior da mesma e é regulado por sinalização proveniente da raiz, sobretudo por ABA. A segunda fase caracteriza-se pela redução do

crescimento resultante do acúmulo de sais no interior da planta. A causa desta injúria é função da elevada quantidade de sal absorvida, a qual ultrapassa a capacidade da planta de compartimentalização no vacúolo, com conseqüentemente aumento na concentração de sais no citoplasma e inibição de atividades de enzimas de várias rotas metabólicas (WILLADINO et al., 1996).

Uma alteração metabólica importante para as plantas sob condições de estresse é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FOYER; NOCTOR, 2005). A produção de ROS é uma resposta primária da planta ao estresse biótico e abiótico, caracterizando um dano oxidativo (CHANDRU et al., 2003). O estresse salino pode acarretar o acúmulo excessivo de ROS nas células, especialmente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MOLLER et al., 2007). Essas espécies reativas são subprodutos do metabolismo aeróbico e fotossintético e, em concentrações compatíveis com a homeostase redox celular são componentes de diversas vias de sinalização (FOYER; NOCTOR 2003). Entretanto, em excesso causa danos oxidativos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, caracterizando o estresse oxidativo secundário (BEN AMOR et al., 2005). Para evitar os danos oxidativos, a concentração das ROS é mantida em níveis não tóxicos por meio de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MOLLER et al., 2007).

A redução do crescimento das plantas, devido à salinidade, também pode ser atribuída à menor absorção de elementos importantes, como cálcio e o potássio (RENGEL, 1992). Em plantas jovens de goiabeira sob estresse salino, Ferreira et al. (2001), observaram redução na concentração de potássio nos tecidos de raízes, caule e folhas. Essa menor absorção de potássio tem sido atribuída à maior competição entre os íons Na^+ e o K^+ pelos sítios de absorção ou a um maior fluxo de potássio das raízes (MARSCHNER, 1995).

A tolerância ao estresse salino é conhecida como a capacidade da planta de crescer e completar seu ciclo de vida quando cultivada em substratos que contêm uma alta concentração de sais solúveis (PARIDA; DAS, 2005). Contudo, não é uma resposta simples, sendo baseada em várias características dependentes de diferentes interações fisiológicas na planta. A resposta morfológica da planta pode não ser suficiente para determinar o efeito do sal no seu desenvolvimento por isso é importante determinar aspectos fisiológicos, bioquímicos (ABDUL QADOS, 2011) e moleculares (ZHU, 2002).

Muitos dos processos de tolerância à salinidade estão envolvidos na homeostase iônica, estes incluem, por exemplo, na codificação de carreadores antiporter Na^+/H^+ da membrana plasmática para extrusão de Na^+ , em carreadores antiporter vacuolares de Na^+/H^+ para compartimentação de Na^+ no vacúolo e transportadores K^+ de alta afinidade para aquisição de K^+ . Ao aumentar a concentração de íons no vacúolo, os antiporteres vacuolares Na^+/H^+ também funcionam na homeostase osmótica. Outros genes que podem ser induzidos pela salinidade estão relacionados com homeostase osmótica, como por exemplo, aqueles que codificam aquaporinas e enzimas na biossíntese de osmólitos. Esses osmólitos também podem funcionar na desintoxicação e na prevenção ou reparo de danos. De fato, a maioria dos genes induzidos pelo sal parece funcionar na limitação ou reparo de danos (ZHU, 2002).

A maioria das vias de transdução de sinal começam com a percepção de um sinal por sensores de estresse, e desencadeiam uma resposta que envolvem intermediários da sinalização, por exemplo, fosfatos de inositol, ROS e ABA. Os mensageiros secundários podem atuar na modulação dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), frequentemente iniciando uma cascata de fosforilação de proteínas, como as envolvendo proteína cinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase* – *MAPK*), ou proteína cinase dependente de cálcio (*Ca²⁺-dependent protein kinases* – *CDPK*), que finalmente tem como alvo as proteínas diretamente envolvidas na proteção celular ou os fatores de transcrição que controlam conjuntos específicos de genes regulados pelo estresse (XIONG et al., 2002).

Uma maior compreensão da base genética e de características com relevância para o estresse de salinidade é importante para melhorar a tolerância nas culturas (ARZANI; ASHRAF, 2016; LEE et al., 2009). A criação de variedades de culturas tolerantes à salinidade é demorada, dada a herança multigênica e a natureza multicomponente da tolerância ao estresse de salinidade (DEROSE-WILSON; GAUT, 2011; NEGRÃO; SCHMOCKEL; TESTER, 2017).

Com o surgimento de tecnologias de sequenciamento de RNA (RNAseq), foi possível acelerar a caracterização do perfil de expressão global dos genes que respondem ao estresse salino (LIU; ZHOU; WHITE, 2014). Análise da expressão do gene GmPAP3, por exemplo, sob estresse salino sugeriu sua contribuição para a tolerância ao sal na soja através da eliminação de espécies reativas de oxigênio (LIAO et al., 2003). A expressões diferenciais de fatores de transcrição como os do tipo bHLH, ZFP, bZIP, YABBY, HD-

Zip, ERF / AP2 e WRKY, apresentaram-se notáveis no papel na regulação da resposta das plantas a estresses abióticos, incluindo estresse por salinidade (CHEN et al., 2014; DEINLEIN et al., 2014; LORENZO et al., 2007; MERCHAN et al., 2007; SANCHEZ et al., 2008; SONG et al., 2012; ZAHAFI et al., 2012; ZHAO et al., 2017).

Trabalhos realizados anteriormente para caracterização de genótipos que apresentassem tolerância a estresses ambientais o grupo de pesquisa da UFES mostrou que em comparação a genótipos amplamente cultivados no país, Paluma e Pedro Sato, as cultivares Cortibel RM, Cortibel LG e o genótipo Cortibel IX apresentaram tolerância ao estresse salino, em testes de germinação de sementes (DALVI, 2012). Estes genótipos são alternativas à cultura da goiabeira por serem produtivas e de adaptabilidade geral (SILVA, 2017), bem como serem estáveis quanto a alterações epigenéticas globais no genoma durante o ciclo de produção, diferente das cultivares Paluma e Pedro Sato (Brandão et al., 2020). A Cortibel LG também destacou-se entre as goiabeiras por apresentar resistência a doenças pós-colheitas (PENA, 2017), não apresentar sintomas de ferrugem ou presença de psilídeo em pomar infestado (SILVA, 2017), além de destacar-se como a única a apresentar frutos em pomar experimental sem irrigação, mesmo em condições de extensas estiagens, indicando variabilidade para mecanismo de tolerância a seca, neste genótipo (dados não publicados).

3.3 A família de genes SnRKs

As proteínas quinases constituem importantes reguladores nas plantas, envolvidas no reconhecimento e transmissão de sinais ambientais por meio de proteínas receptoras de membrana, que por sua vez ativam diferentes proteínas ligadas as vias de fosforilação, culminando na regulação da expressão de genes de resposta e tolerância ao estresse (CAKMAK et al., 2012). As SnRKs são proteínas serina-treonina quinases presentes amplamente em plantas. São divididas em 3 subfamílias: SnRK1, SnRK2 e SnRK3 (ALBRECHT et al., 2001; KULIK et al., 2011). As proteínas SnRK1 são homólogas às de leveduras e mamíferos e tem estrutura altamente conservada, com a presença de domínio catalítico terminal, Pkinase, que desempenha um papel importante na regulação do metabolismo do carbono, e um domínio UBA e um domínio KA1 (OHTA et al., 2003). As subfamílias SnRK2 e SnRK3 são exclusivas de plantas. Ambas possuem membros

mais diversificados comparadas a subfamília SnRK1. As SnRK2s, possuem apenas um domínio catalítico do tipo Pkinase no N-terminal (HARDIE; CARLING; CARLSON, 1998). As SnRK3 podem ligar-se à proteína semelhante à calcineurina B (CBL) para participar de respostas ao estresse mediada por Ca^{2+} , possuem o domínio de cinase conservado e no C-terminal tem dois domínios conservados: NAF e PPI (PURCELL; SMITH; HALFORD, 1998; RAMON et al., 2019).

Há fortes evidências de que as subfamílias gênicas SnRK2 e SnRK 3 evoluíram após a duplicação do gene de SnRK1, devido a presença de 42 a 45% de identidade de sequência de aminoácidos com SnRK1 na região catalítica como mostrado em estudos com *A. thaliana* (HALFORD; HEY, 2009). A evolução dessas duas novas subfamílias em plantas permitiu o desenvolvimento de redes capazes de responder a estresse por sinalização por ABA e sinalização de cálcio com respostas metabólicas e epigenéticas (HALFORD; HEY, 2009)

Em *Arabidopsis thaliana*, a família de genes SnRK é composta por 38 membros divididos nas subfamílias: SnRK1 (3 genes), SnRK2 (10 genes) e SnRK3 (25 genes) (HRABAK et al., 2003). SnRK1 vem sendo associado ao aumento da tolerância ao estresse de nitrogênio (WANG et al., 2012) e ao sensoriamento de energia e regulação gênica (ROBAGLIA; THOMAS; MEYER, 2012), as SnRKs foi considerado um alvo potencial para melhorar o desempenho da planta sob condições desfavoráveis causadas tanto por estresses abióticos quanto por estresses bióticos como demonstrados em organismos modelos como *A. thaliana* (COELLO; HEY; HALFORD, 2011). SnRK2 e SnRK3 mostraram ter também um papel fundamental nas vias de sinalização que regulam a resposta da planta à limitação de nutrientes, seca, frio, sal e estresse osmótico (COELLO; HEY; HALFORD, 2011). A subfamília SnRK2 tem um papel essencial na regulação da expressão pela ativação de fatores de transcrição bZIP e complexos SWI/SNF/ helicase, fortemente conectados a mecanismos epigenéticos que controlam a ativação ou repressão desses genes (BAENA-GONZÁLEZ; SHEEN, 2008; FUJII; VERSLUES; ZHU, 2011).

SnRK3 cinases conhecidas como CIPKs, desempenham funções importantes na resistência a vários estresses em plantas (UMEZAWA et al., 2004). Por exemplo, o sistema SOS (excessivamente sensível ao sal - *salt overly sensitive*) demonstrado em *A. thaliana* foi a primeira descoberta via CBL-CIPK descrita, nesse processo o sinal de cálcio produzido pelo estresse salino é detectado por SOS3 na membrana celular e, em

seguida, SOS3 combinado com SOS2 formando complexo para fosforilar SOS1 (Na^+/H^+ antiporter) para remover excesso de Na^+ fora das células da raiz (HUAI et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2004).

Na família Myrtaceae estudos com *Eucalyptus* spp apresentaram expressão diferencial de genes SnRK sob estresse salino (WANG et al., 2019). Para *Psidium guajava*, um estudo preliminar quanto a tolerância a salinidade por análises de germinação de sementes revelou o potencial das cultivares Cortibel LG e RM para tolerância à salinidade e sensibilidade da cultivar Paluma (DALVI, 2012) a mais cultivada no país (VITTI; DE LIMA; FILHO, 2020). Contudo, não há indícios de estudos relacionados aos genes que estão envolvidos na resposta ao estresse salino para a espécie. O avanço do conhecimento, neste sentido, irá contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares para a tolerância a salinidade em goiabeira, uma espécie de ampla adaptação a ambientes adversos, podendo gerar estratégias para o melhoramento visando tolerância a esta condição.

4. CAPITULO I: A FAMÍLIA DE GENES SnRKs EM *Psidium guajava*: PERSPECTIVAS PARA TOLERANCIA AO ESTRESSE SALINO

4.1. Introdução:

Por serem organismos sésseis as plantas desenvolvem vários mecanismos de defesa molecular para lidar com diversos estresses abióticos como a salinidade, seca e temperatura. Mecanismos como regulação da expressão gênica e a modificação de proteínas são duas maneiras importantes para as plantas enfrentarem essas adversidades (BOHNERT et al., 2006). Os genes SnRKs por se tratarem de proteínas quinases constituem reguladores nas plantas envolvidos no reconhecimento e transmissão de sinais ambientais (CAKMAK et al., 2012), essas proteína são divididos em três subfamílias em plantas: SnRK1, SnRK2 e SnRK3 com base em similaridade de sequência e estruturas gênicas (HALFORD; HEY, 2009; HRABAK et al., 2003).

A subfamília SnRK1 é relativamente pequena e está envolvida principalmente na regulação metabólica que afeta o desenvolvimento das plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, são descritos três genes para essa subfamília (HRABAK et al., 2003). Os genes SnRK1 são semelhante a SNF-1 presentes em levedura, que estão envolvidos no metabolismo do carbono (HALFORD; HEY, 2009).

As SnRK2 desempenha papel importante na via de transdução de sinal por ABA, estresse osmótico e no metabolismo do açúcar, demonstrado em diversos organismos modelos (HRABAK et al., 2003; HUAI et al., 2008). Em *A. thaliana*, essa subfamília pode ser dividida em dois grupos com base na ativação por ABA, um grupo composto por quinases ativadas por ABA e estresses hiperosmóticos (AtSnRK2-2, AtSnRK2-3, AtSnRK2-6, AtSnRK2-7, e AtSnRK2-8) e o outro composto por quinases ativadas apenas por condições hiperosmóticas (incluindo AtSnRK2-1, AtSnRK2-4, AtSnRK2-5 e AtSnRK2-10). A AtSnRK2-9 de *A. thaliana* não foi ativada por manitol, NaCl, resfriamento e ABA, mostrando-se divergente dos demais membros dessa subfamília (BOUDSOCQ; BARBIER-BRYGOO; LAURIÈRE, 2004). Esta família de genes também foi estudada em plantas cultivadas, como arroz (KOBAYASHI et al., 2004) milho (HUAI et al., 2008) e soja, para as quais foram descritos 22 genes para a subfamília SnRK2 (ZHAO et al., 2017b). A superexpressão de genes da subfamília SnRK2 em *A. thaliana*, *Zea mays* e *Nicotiana tabacum* é descrita como um fator para

umentar a tolerância das plantas ao sal e outros estresses principalmente por apresentares respostas mediadas ou não por ABA (FENG et al., 2019; ZHANG et al., 2011). Estudos ainda como essa subfamília em *Nicotiana tabacum* mostrou que plantas superexpressando TaSnRK2.9 apresentaram elevado teor de ABA, indicando uma possível função dependente de ABA para este gene da subfamília SnRK2. Ainda a superexpressão de TaSnRK2.9 aumentou a expressão de outros genes relacionados com a via de ROS, de ABA e de outras resposta ao estresse sob tratamento osmótico e salino (FENG et al., 2019).

Estudos de expressão gênica transitória em protoplastos, demonstrou que os genes pertencentes a subfamília SnRK2s de *Arabidopsis thaliana*, exceto AtSnRK2.9, são rapidamente ativado por tratamento com diferentes osmólitos, como sacarose, manitol, sorbitol ou NaCl, e alguns deles também por ABA, sugerindo que essas cinases estão envolvidas em uma resposta geral ao estresse osmótico (BOUDSOCQ; BARBIER-BRYGOO; LAURIÈRE, 2004; BOUDSOCQ; LAURIÈRE, 2005).

Dentre as Myrtaceae a família de genes SnRKs foi descrita para *Eucalyptus grandis*, apresentando dois genes para a subfamília SnRK1, oito para a subfamília SnRK2 e 24 para a subfamília SnRK3 (WANG et al., 2019). Em *E. grandis*, ainda, é relatado que os genes EgrSnRK2.2, EgrSnRK2.4, EgrSnRK2.5, EgrSnRK3.2, EgrSnRK3.3, EgrSnRK3.5 e EgrSnRK3.18 foram fortemente *up-regulados* nas folhas e raiz em indivíduos expostos à diferentes concentrações de NaCl. Alguns genes sofreram mudanças de expressão de acordo com o tempo de exposição a NaCl, como o EgrSnRK3.3 quem em 24h e 168 h, que foi cinco e dez vezes maior na raiz, respectivamente, em comparação aos demais tecidos (WANG et al., 2019).

Eucalyptus grandis é uma Myrtaceae de frutos capsulares secos, tais como as pertencentes as tribos Eucalypteae, Melaleuceae e Leptospermeae, as quais são ausentes nas Américas (PILLON et al., 2015; PADOVAN et al., 2014). As espécies de frutos carnosos da família, como *P. guajava*, incluem as tribos economicamente importantes como Myrteae, com principais centros de diversidade na Austrália e na América do Sul, e Syzygieae com riqueza de espécies nas florestas tropicais da Malásia ao nordeste da Austrália (CRAVEN, 2001; WILSON, 2011).

Os diferentes ambientes delimitados por espécies da grande família Myrtaceae podem revelar diferenças na evolução de genes responsivos às interações abióticas

proporcionadas pelos mesmos. Gêneros da família como *Eugenia*, *Myrcia* e *Psidium* com 100 espécies ou mais, apresentam contribuição desproporcional para a diversidade e abundância total em áreas Neotropicais (ZAPPI, 2015; BEECH et al., 2017; KOCHUMMEN et al., 1990; KURSAR et al., 2009, OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000) e podem constituir, portanto, importantes referências em estudos de evolução de famílias gênicas responsivos a condições ambientais.

No Brasil, a goiabeira é amplamente cultivada no país e a região nordeste a de maior produção (IBGE, 2018). Nessa região ocorre falta de precipitação e auto processo de evaporação das águas superficiais do solo, condições que aumentam o processo de salinização do solo. A família de SnRKs, desempenha grande importância na resposta ao estresse salino, estudos desenvolvidos com *Zea mays* e algas como *Chlamydomonas reinhardtii* mostraram respostas tanto pelas vias dependente e independente de ABA, além da via SOS, exclusiva para processo de desintoxicação celular gerada pelo excesso de sal na célula (CAKMAK et al., 2012; HUAI et al., 2008).

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo identificar e caracterizar a família de genes SnRKs no genoma da goiabeira e comparar a expressão desses genes em dois genótipos cultivados, Paluma e Cortibel RM, bem a variabilidade dos genótipos por identificada pela presença de SNPs nos genes SnRKs, que constituem genótipos contrastantes para a tolerância a estresse e salino de goiabeiras. Os resultados observados nesse estudo podem formar subsídios para os avanços dos programas de melhoramento da cultura, principalmente relacionados a tolerância ao estresse salino.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Anotação de genes SnRKs no genoma de *Psidium guajava*

A anotação dos genes SnRKs foi inicialmente realizada por alinhamento de sequências de proteínas SnRKs de *Arabidopsis thaliana* (HRABAK et al., 2003) e de *Eucalyptus grandis* (WANG et al., 2019) no genoma de referência de *P. guajava*, NCBI - PRJNA631442 (FENG et al., 2020). Foram consideradas as proteínas com alinhamentos de e-value inferiores a 10^{-50} , resultando em 46 proteínas. A partir destas, realizou-se buscas com base em perfis de modelo de Markov oculto (HMM), utilizando-se os domínios pertencentes em genes SnRK, obtidos no banco de dados Pfam. Para a

determinação da subfamília SnRKs levou-se em consideração os domínios característicos de cada subfamília: para a subfamília SnRK1 o domínio Pkinase (PF00069), UBA (PF00627) e KA1 (PF02149); para a subfamília SnRK2 com a presença dos domínios Pkinase (PF00069) e; para a e subfamília SnRK3 os domínios Pkinase (PF00069) e NAF (PF03822). Sendo mantidas nas análises somente sequências de proteínas com domínio Pkinase completo, totalizando 29 genes oriundos do genoma de referência da cultivar “New Age” proveniente da China.

O mesmo procedimento foi adotado para a anotação dos genes SnRKs no draft do genoma *P. guajava* (dados *in house*, guavadb.ufes.br), oriundo de duas cultivares brasileiras Paluma e Cortibel RM, sendo detectados 43 genes por homologia e presença dos domínios. A partir dos dois conjuntos de proteínas realizou-se BLASTp e posteriormente uma análise filogenética como forma de verificar a similaridade das sequências encontradas nos dois genomas.

4.2.2. Análise filogenética SnRKs

Sequências de proteínas com domínios SnRKs característicos foram alinhadas com M-Coffee (<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/index.html>) (WALLACE et al., 2006). Árvores filogenéticas obtidas a partir da metodologia de máxima verossimilhança (ML) foram reconstruídas na plataforma PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) utilizando os parâmetros padrões (GUINDON et al., 2010). Diferentes árvores foram obtidas incluindo as sequências de proteínas SnRKs de *P. guajava* e também de sequências ortólogas (*Arabidopsis thaliana* e *Eucalyptus grandis*).

4.2.3. Análise estrutural: identificação de motivos e estruturas gênicas

Para identificar motivos conservados das proteínas SnRKs anotadas, utilizou-se a Maximização de Múltipla Expectativa para Elicitação de Motivos (MEME) (<http://meme.sdsc.edu/meme/itro.html>) (BAILEY et al., 2009) com os seguintes parâmetros: número de repetição = qualquer, número máximo de motivos = 20; e comprimento ótimo do motivo = 6 a 200 resíduos de aminoácidos.

A partir das proteínas anotadas foram identificadas as posições, os tamanhos e o número de éxons e íntrons de cada gene SnRK de *P. guajava*. As estruturas éxon-íntron dos genes foram analisados usando o Gene Structure Display Server (GSDS: <http://gsds.cbi.pku.edu.ch>) (HU et al., 2015). As informações de tamanho do cromossomo

e informações de localização dos genes SnRK dos dois genomas utilizados foram obtidos nos dados *in house*, *guavadb* e no NCBI. O mapa online Gene2 Chrom web v2 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) foi implementado para mapear as posições cromossômicas dos genes SnRK de *P. gujava*.

4.2.4. Análise de expressão gênica dos genes SnRKs em diferentes tecidos das cultivares brasileiras

Dados do transcriptoma de diferentes tecidos das cultivares Paluma e Cortibel RM, oriundos do banco de dados *in house*, foram utilizados para verificar a abundância e expressão diferencial dos genes SnRKs anotados. Estas cultivares apresentam diferentes respostas de tolerância ao estresse salino em ensaio de germinação de sementes sob estresse salino (Dalvi, 2012). Para comparação utilizou-se transcriptomas obtidos dos tecidos: folha madura, folha jovem, broto, botão floral e raiz para cada genótipo. Para a coleta dos tecidos, foram utilizadas mudas de aproximadamente 100 dias, crescidas em viveiro. Doze plantas mais uniformes de cada genótipo foram selecionados com base em suas características morfológicas, a fim de garantir a homogeneidade das amostras. Para cada tecido, amostras de quatro plantas foram coletadas e misturadas em igual proporção, para formar dois pools de cada genótipo. Os tecidos foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e transferidos para freezer -80°C

Para as análises de expressão genica foram usados dados obtidos após a etapa de alinhamento das bibliotecas de *reads* filtrados. Foram obtidos os valores de *reads counts*, que representam o número de *reads* que mapearam em um gene. Essa metodologia baseia-se na distribuição binomial negativa, aplicada para calcular a variação da expressão de um transcrito entre diferentes amostras. Tais análises foram realizadas com uso do pacote `função DESeq2::deseq()` (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) em linguagem R (R Core Team, 2018, version 3.5.1)

Para garantir a qualidade do processamento dos dados somente foram aceitas para expressão diferencial, genes presentes nas duas repetições biológicas. Consideramos genes diferencialmente expressos aquelas que apresentaram médias significativamente diferentes das duplicatas pelo teste t (valor de $p < 0,05$) e com expressão $> 1,5$ vezes para maior ou menor (*fold change*). As comparações foram feitas a nível de tecido, comparando as cultivares.

Outras análises exploratórias foram feitas utilizando os dados de contagem de reads utilizando uma normalização Z, Com o objetivo de avaliar os grupos de amostras, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada usando `prcomp::stats v.3.5.1` (R Core Team, 2018, version 3.5.1) e plotada usando `ggbiplot::ggbiplot v.0.55` (Vu, 2011, version 0.55) no Software R. Foi gerado também um *heatmap* e agrupamentos hierárquico Ward-MLM (*Modified Location Model*) e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) entre os perfis de expressão diferencial usando pacote::função `heatmaply::heatmaply()` (GALILI et al., 2018).

4.2.5. Análise variabilidade genética de germoplasma de goiabeiras, por SNPs detectados em genes SnRKs

Dados da anotação de SNPs provenientes de 62 genótipos de goiabeiras brasileiras obtidas pela metodologia DArTseq (KILIAN et al., 2012), descrito por Sousa, 2019 foram utilizados no alinhamento com os genes SnRKs anotados no genoma de *P. guajava*. Foram utilizadas sequências variando entre 22 a 69 bases. Dos alinhamentos obtidos verificou-se polimorfismos em oito genes nos genótipos avaliados. A partir dos dados de polimorfismos realizou-se uma matriz de distância e uma análise de agrupamento dos genótipos UPGMA.

4.3. Resultados

Considerando os resultados do genoma de referência um total de 29 SnRKs genes candidatos foram identificados no genoma de referência de *Psidium guajava* genótipo New Age. As características estruturais dos genes como localização nos cromossomos, tamanho dos genes em pares de base (pb), número de aminoácidos (a.a.) das proteínas e o número de éxons foram identificados (Tabela 1). O número de aminoácidos variou de 278 a 1.292, com tamanho médio de 439. Dois genes foram classificados como pertencentes a subfamília SnRK1, característicos por conter o domínio Pkinase (PF00069 de Pfam), UBA (PF00627) e KA1 (PF02149); 14 genes foram identificados para a subfamília PgSnRK2 com a presença do domínio Pkinase (PF00069); e outros 13 apresentando domínios Pkinase (PF00069) e NAF (PF03822) característicos na subfamília SnRK3.

Tabela 1: Lista de genes SnRK identificados no genoma de referência de *Psidium guajava*, genótipo New Age (genes com a inicial ctg) e no draft das cultivares brasileiras (genes com a inicial g) (*correspondem a genes similares encontrados em ambos os genomas)

Nome	Gene Identificador	Chr/ Scaffolding	Posição (5'-3')	Tamanho (p.b.)	Número de (a.a.)	Número de Éxons
PgSnRK1.1	ctg17.622.4	Chr02	3847067-3847115	1359	453	8
PgSnRK1.2	ctg40.1225	Chr10	20226657-20227247	1122	374	7
PgSnRK2.1	ctg24.124	Chr05	1584193-1584453	1158	386	11
PgSnRK2.2	ctg14.1336	Chr08	47897597-47897716	1065	355	9
PgSnRK2.3	ctg14.1104	Chr08	44708279-44708727	1020	340	9
PgSnRK2.4	ctg29.65	Chr09	32526226-32526754	1068	356	10
PgSnRK2.5	ctg29.369	Chr09	29072519-29073044	1089	363	9
PgSnRK2.6	ctg32.367	Chr04	27844238-27844507	1011	337	9
PgSnRK2.7	ctg8.614	Chr07	4029424-9402543	1062	354	9
PgSnRK2.8	ctg30.767	Chr09	17611701-17612301	1056	352	9
PgSnRK2.9*	ctg34.364	Chr01	4664873-4665166	1446	482	6
PgSnRK2.10*	ctg15.1215	Chr02	30189236-30189339	2892	964	14
PgSnRK2.11*	ctg39.334	Chr01	37519747-37520507	3876	1.292	22
PgSnRK2.12*	ctg39.260	Chr01	36814574-36814741	1038	346	9
PgSnRK2.13*	ctg7.264	Chr07	30068234-30068333	2502	834	18
PgSnRK2.14*	ctg32.138	Chr04	30636853-30637028	834	278	7
PgSnRK2.15	g1370	7180000010004	136517-145126	2005	607	5
PgSnRK2.16	g3305	7180000010922	194276-202890	2680	1300	18
PgSnRK2.17	g8227	7180000010832	11926-33775	14158	709	22
PgSnRK2.18	g8877	7180000010864	61420-66206	8730	582	7
PgSnRK2.19	g9263	7180000010046	128506-135060	12915	396	11
PgSnRK2.20	g10770	7180000010394	407427-417096	4406	448	14
PgSnRK2.21	g12246	7180000010936	113218-118726	1700	568	11
PgSnRK2.22	g12999	7180000009958	91596-97100	6450	574	11
PgSnRK2.23	g13996	7180000010013	250847-255616	1510	600	11

Continua

Continuação						
Nome	Gene Identificador	Chr/ Scaffolding	Posição (5'-3')	Tamanho (p.b.)	Número de (a.a.)	Número de Éxons
PgSnRK2.24	g15622	7180000009628	217991-221766	5748	606	7
PgSnRK2.25	g15846	7180000009522	262074-268386	1685	549	16
PgSnRK2.26	g16693	7180000010598	144-23136	8191	1024	19
PgSnRK2.27	g18906	7180000010004	136517-145126	2005	607	5
PgSnRK2.28	g23316	7180000010424	68696-83120	3706	1006	26
PgSnRK2.29	g23709	7180000010837	186296-193180	4090	700	8
PgSnRK2.30	g3173	7180000012719	28552-34956	4787	447	8
PgSnRK2.31	g4434	7180000010099	292616-01700	6555	487	9
PgSnRK2.32	g4751	7180000009980	84687-90346	9670	449	4
PgSnRK2.33	g20096	7180000013237	184926-197765	5505	924	17
PgSnRK2.34	g22336	7180000009623	446536-451656	4770	884	11
PgSnRK2.35	g28219	7180000010225	165136-169760	3776	364	6
PgSnRK2.36	g28470	7180000009841	145646-152240	6313	742	8
PgSnRK2.37	g33141	7180000009884	139106-142030	22993	490	3
PgSnRK2.38	g34732	7180000013556	173657-191066	14425	1192	16
PgSnRK3.1*	ctg34.423	Chr07	5444897-5447239	1431	477	3
PgSnRK3.2*	ctg19.117	Chr03	1331319-1331874	1404	468	15
PgSnRK3.3*	ctg25.65	Chr05	4479350-4479991	1338	446	13
PgSnRK3.4*	ctg22.182	Chr03	26802612-26805065	1401	467	15
PgSnRK3.5*	ctg14.177	Chr08	31511381-31512466	1314	438	1
PgSnRK3.6*	ctg33.326	Chr04	9594621-9595634	1368	456	15
PgSnRK3.7*	ctg15.1175	Chr02	30538415-30539101	1035	345	12
PgSnRK3.8*	ctg15.1341	Chr02	28930274-28930453	1317	439	12
PgSnRK3.9*	ctg28.355	Chr05	34148710-34150039	1590	530	3
PgSnRK3.10*	ctg40.1544	Chr10	25933062-25933273	1332	444	1
PgSnRK3.11*	ctg40.2415	Chr10	35889922-35891032	1356	452	1
PgSnRK3.12*	ctg20.457	Chr03	10716894-10716965	1314	438	14
PgSnRK3.13*	ctg23.758	Chr03	40509472-40509903	1335	445	15

Outros 43 SnRKs genes candidatos foram identificados no genoma de *Psidium guajava* banco de dados *in house* (Tabela 1), foram verificadas com a localização nos scaffolds, tamanho dos genes em pares de base (pb), número de aminoácidos (a.a.) das proteínas e o número de éxons. O número de aminoácidos variou de 283 a 1300, com tamanho médio 617. Dentre as sequências identificadas nos dois genomas, seis da subfamília SnRK2 foram comuns, assim como todas as 13 constituintes da subfamília SnRK3 como pode ser visto no diagrama de venn (Figura 1), os genes que apresentaram semelhanças entre os dois genomas foram mantidos somente as sequencias correspondentes no genoma de referência para as análises ajusante.

Os membros da família SnRK1 possuem entre 7 e 8 éxons; dois clados foram verificados para a subfamília SnRK2, o clado que inclui os genes 2.1 a 2.8, os quais possuem entre 9 a 11 éxons, também inclui os genes SnRK2 de *Eucalyptus grandis* e *Arabidopsis thaliana*. Os SnRK2 do outro clado, tem maior variação, entre 3 a 26 éxons. Os genes da subfamília PgSnRK3 apresentam genes com 1 a 15 éxons (Figura 2).

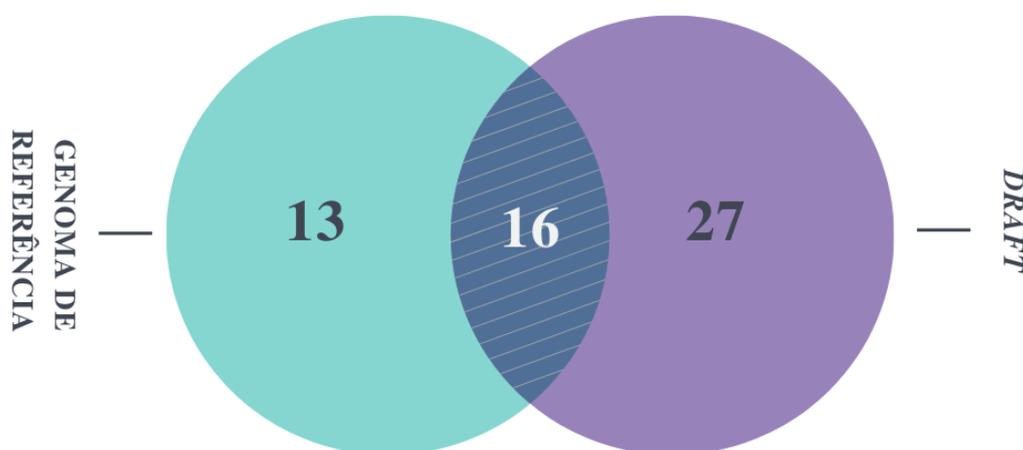


Figura 1. Diagrama de Venn mostrando o compartilhamento dos genes SnRKs pelo genoma de referência e pelo draft das cultivares brasileiras

Vinte motivos foram identificados, cada um foi anotado pesquisando Pfam. Os motivos 1, 2, 5, 15 e 20 codificam um domínio de proteína Pkinase, enquanto o motivo 14 e 15 codificam um domínio NAF (Apêndice 1), os demais motivos não possuem anotação funcional no Pfam. As sequencias de aminoácidos de cada motivo são descritas no apêndice 2

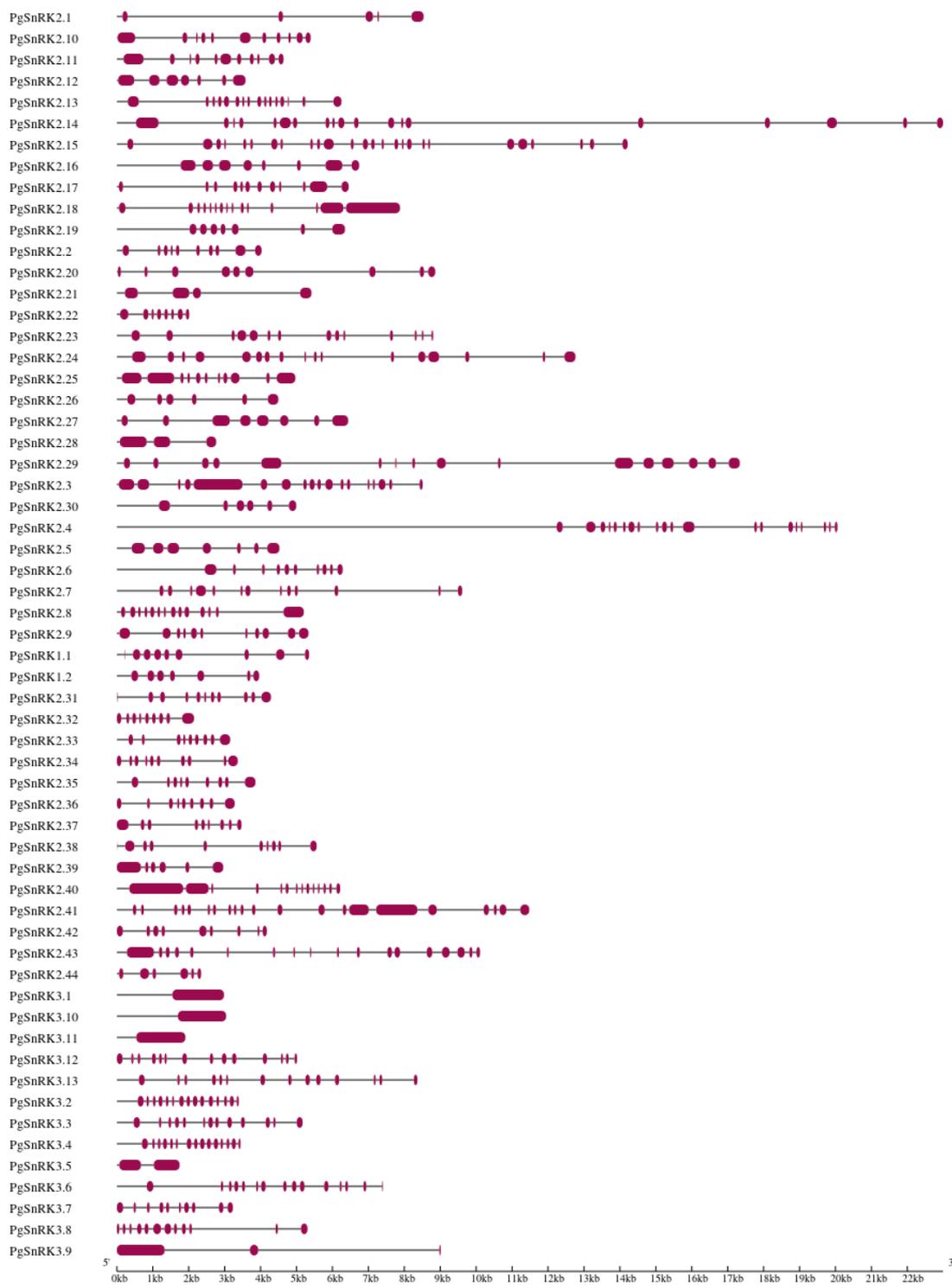


Figura 2: Estruturas gênicas dos genes SnRK em *P. guajava*. Os éxons são indicados pelas estruturas em roxo as linhas cinzentas conectando dois éxons representam íntrons.

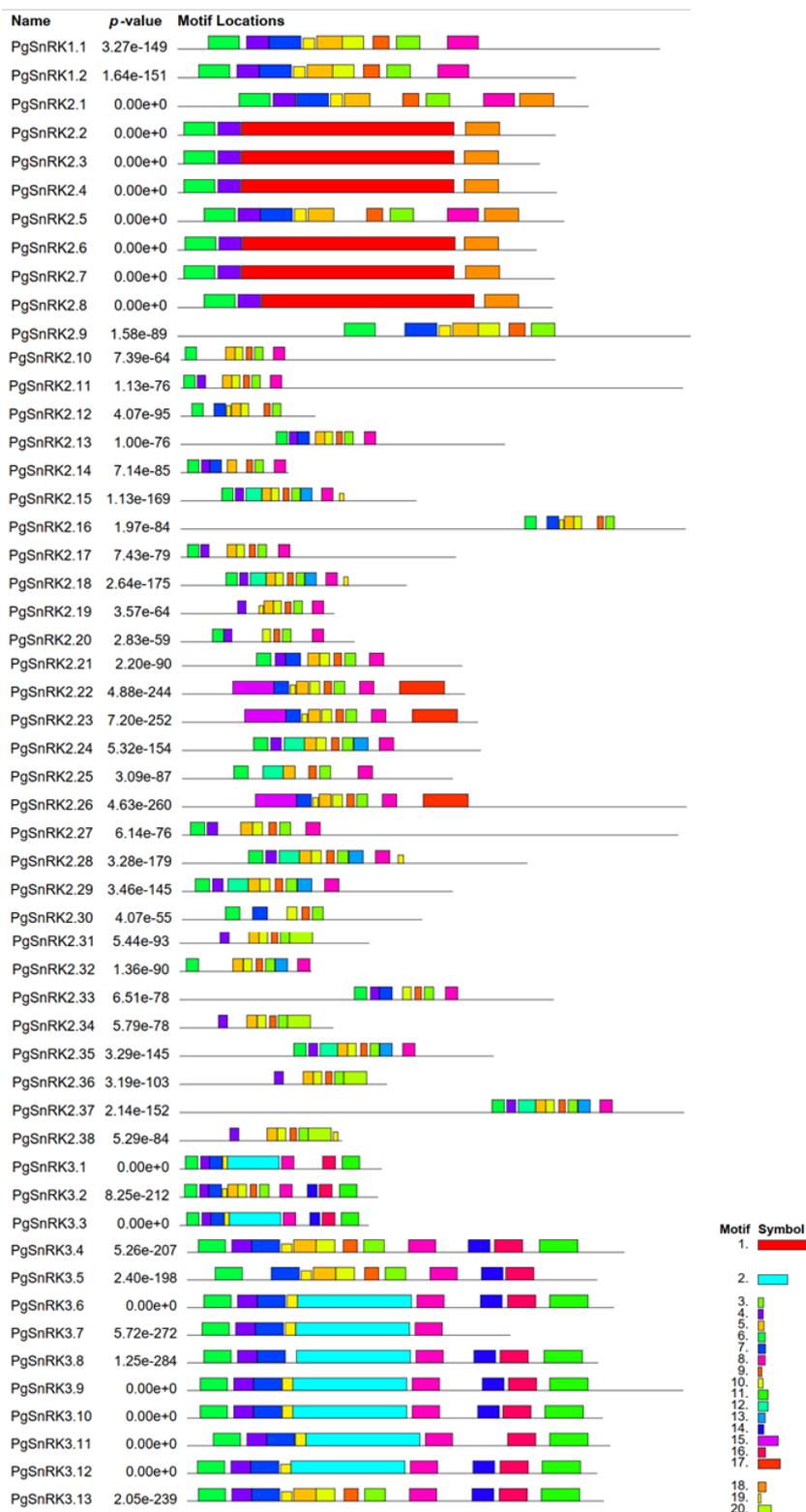


Figura 3. Motivos conservados de genes SnRK em *P. guajava*. Distribuição dos 20 motivos conservados na Genes PgSnRK após análise MEME. As caixas com cores diferentes representam motivos diferentes, na parte superior da figura representa a posição de cada motivo em cada sequência de PgSnRKs. Na parte inferior, são as sequências de resíduos de aminoácidos que constitui os motivos conservados identificados nos genes PgSnRK.

Os genes PgSnRK apresentaram os motivos 6 e 3 são comuns aos genes da subfamília SnRK1, ao grupo da subfamília PgSnRK2.1 ao PgSnRK2.8 e a todos da subfamília SnRk3 (Figura 3). Os demais genes da subfamília PgSnRK2 também possuem ao menos um desses representantes. Na subfamília PgSnRK3 ainda é possível visualizar a presença de outro dois motivos (8 e 10) que são comuns a todos os membros da subfamília, e quase todas o domínio 14 e 16 que possui anotação funcional para o domínio NAF, característico dessa subfamília. As sequências PgSnRK2.9 a PgSnRK2.38, que formaram um grupo diverso nas análises filogenéticas, também apresentaram estruturas de motivos conservados distintas, sendo possível visualizar a presença de motivos em sua constituição, que possuem anotação funcional para o domínio Pkinase (5 e 20). A localização dos genes SnRKs nos cromossomos foi feita com o genoma de referência, a análise indicou que geralmente estão localizados nas extremidades dos mesmos e pouco agrupamento, a exemplo do cromossomo 2. Os cromossomos 6 e 11 não possuem genes SnRKs identificados (Figura 4)

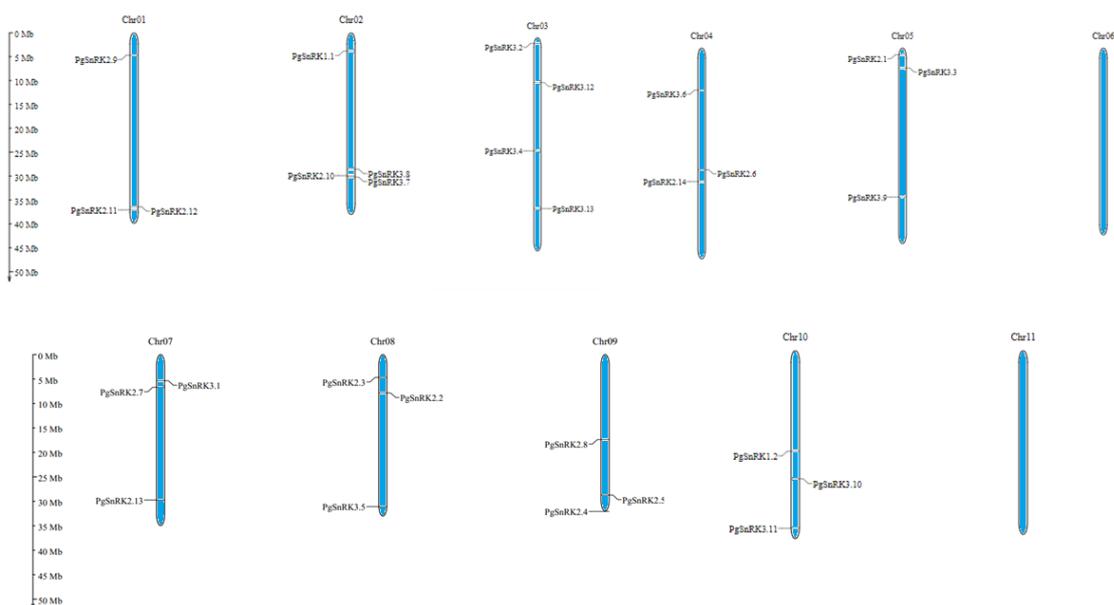


Figura 4: Localização cromossômica dos genes SnRKs, com base nos dados no genoma de referência de *Psidium guajava*, genótipo New Age.

A análise filogenética dos genes SnRKs obtidos com os genes oriundos do genoma de referência (Figura 5), indicou que os genes podem ser divididos em três grupos em

combinação com uma análise do domínio serina-treonina cinase por Pfam. A subfamília SnRK2 teve o maior número de membros (14), seguido pela subfamília SnRK3 (13) enquanto apenas dois membros foram identificados para a subfamília SnRK1. Os genes SnRK de cada grupo foram distribuídos uniformemente, porém, revelou uma linhagem específica de SnRKs para *P.guajava* para a subfamília PgSnRK2 constituídos pelas PgSnRK2.9, PgSnRK2.10, PgSnRK2.11, PgSnRK2.12, PgSnRK2.13 e PgSnRK2.14, que apesar de conter somente o domínio Pkinase, apresentam ter uma relação filogenética muito mais próxima da subfamília PgSnRK3.

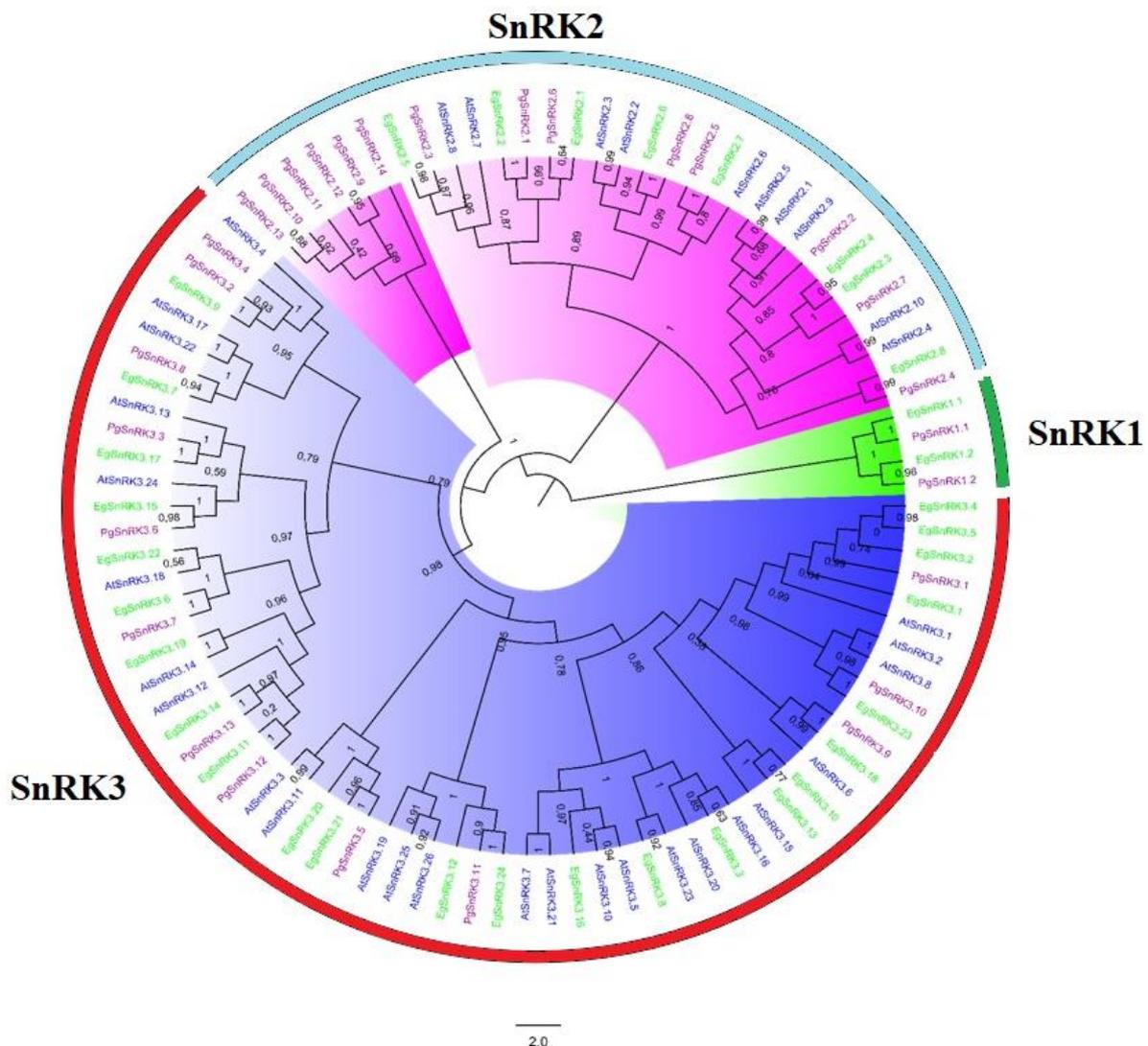


Figura 5: Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRKs obtidas pelo genoma de referência de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 29 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança.

Com o draft das cultivares brasileira também foram realizadas análises filogenéticas dos genes SnRKs, na Figura 6 é possível visualizar que não ocorreu proximidade dos genes nas famílias SnRK1 e SnRK2 de *P. guajava* com *A. thaliana* e *E. grandis*, formando apenas um grupo com os genes classificados como SnRK2 específicos de *P. guajava*.

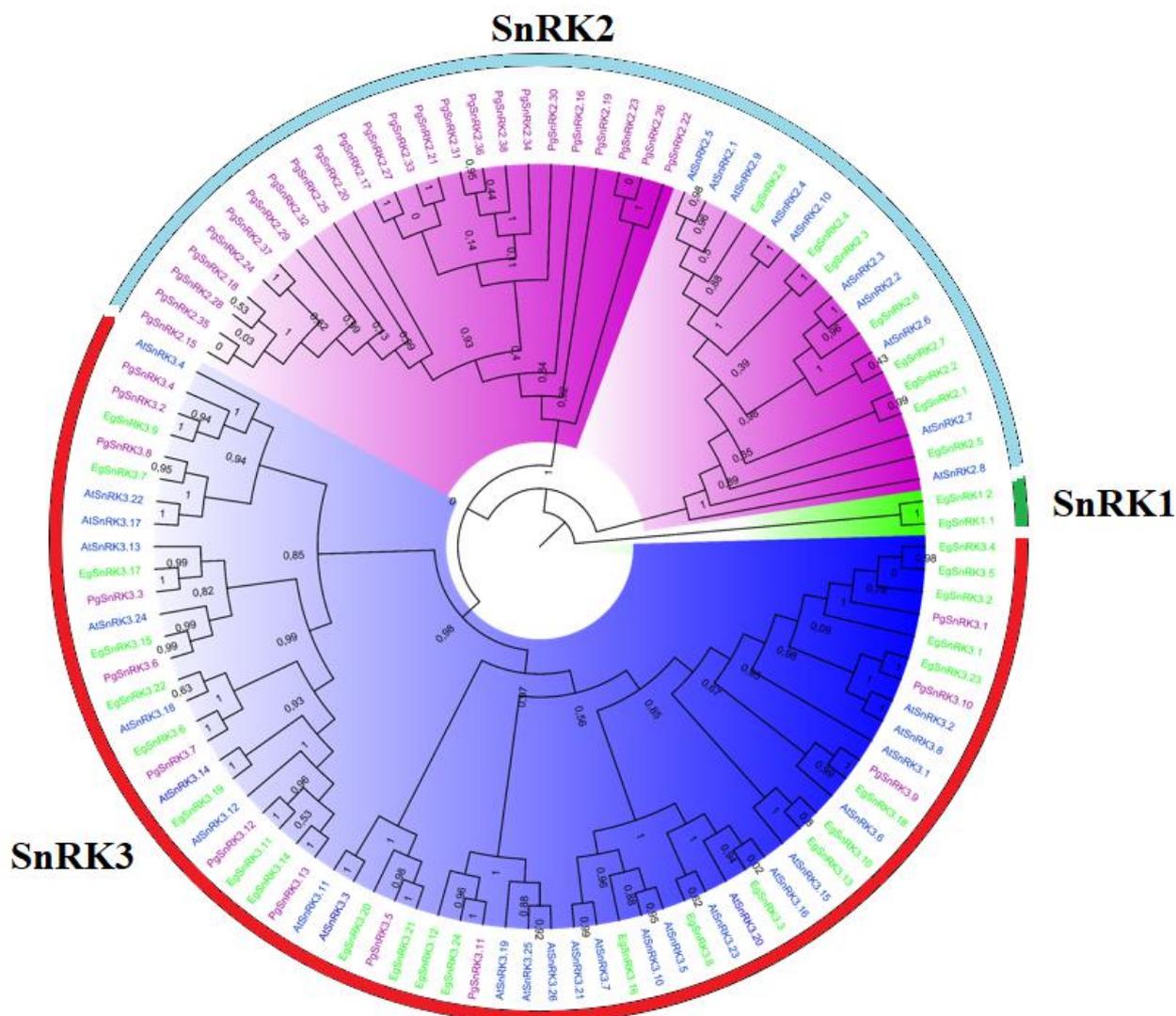


Figura 6. Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRKs obtidas pelo draft do genoma de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 37 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança.

Como forma de ver a distribuição dos genes tanto do genoma de referência quanto do draft das cultivares brasileiras, foi realizado a construção de uma árvore filogenética com as proteínas encontradas em ambos os genomas (Figura 7).

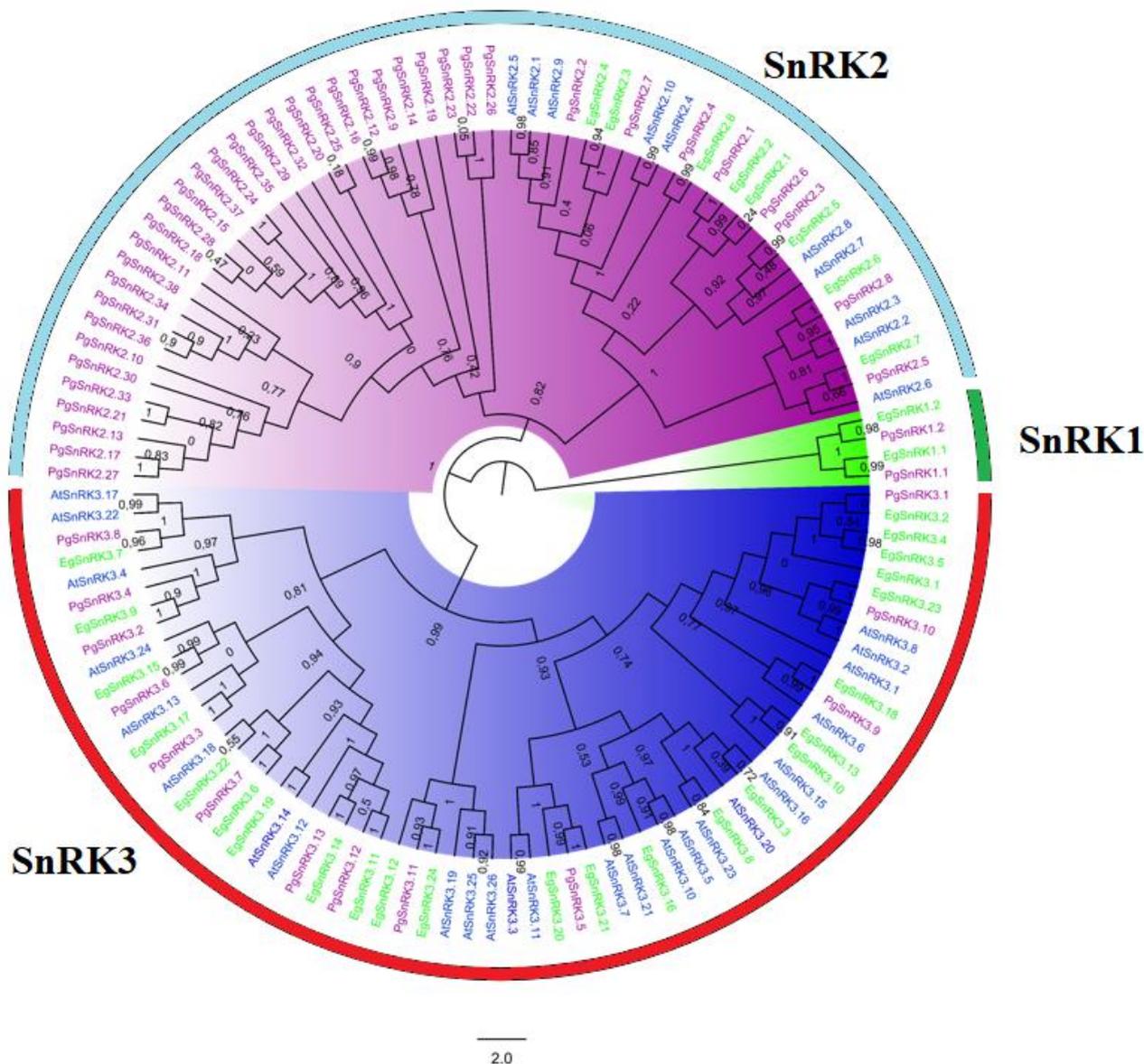


Figura 7: Árvore filogenética das sequências de proteínas de SnRK obtidas pelo genoma de referência e o *draft* do genoma de *Psidium guajava*, *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*. 56 genes PgSnRK, 39 genes AtSnRK e 34 EgrSnRK são agrupados em três subgrupos (SnRK1, SnRK2 e SnRK3). Os genes SnRK de *P. guajava* são demarcados de roxo de *E. grandis* de verde e de *A. thaliana* de azul. A árvore foi gerada usando o software Fig Tree v1.4.4 usando o método de máxima verossimilhança.

A análise de expressão gênica dos SnRKs por componentes principais PCA, nos diferentes tecidos dos genótipos Paluma e Cortibel RM, evidenciou similaridade das réplicas biológicas de cada tecido indicando que as condições experimentais foram bem controladas (Figura 8). Em geral a abundância relativa dos transcritos relacionados a família de dos genes SnRKs, foi similar entre as amostras de mesmo tecido formando cinco grupos distintos. Houve maior similaridade de expressão entre os tecidos de folhas, jovem e madura, e também entre broto e botão floral. Os tecidos de raiz apresentaram perfil de expressão bem distinto. A formação de dois subgrupos em cada tecido, evidenciou o efeito dos genótipos, demonstrando diferença entre o mesmo tecido de Cortibel RM e Paluma

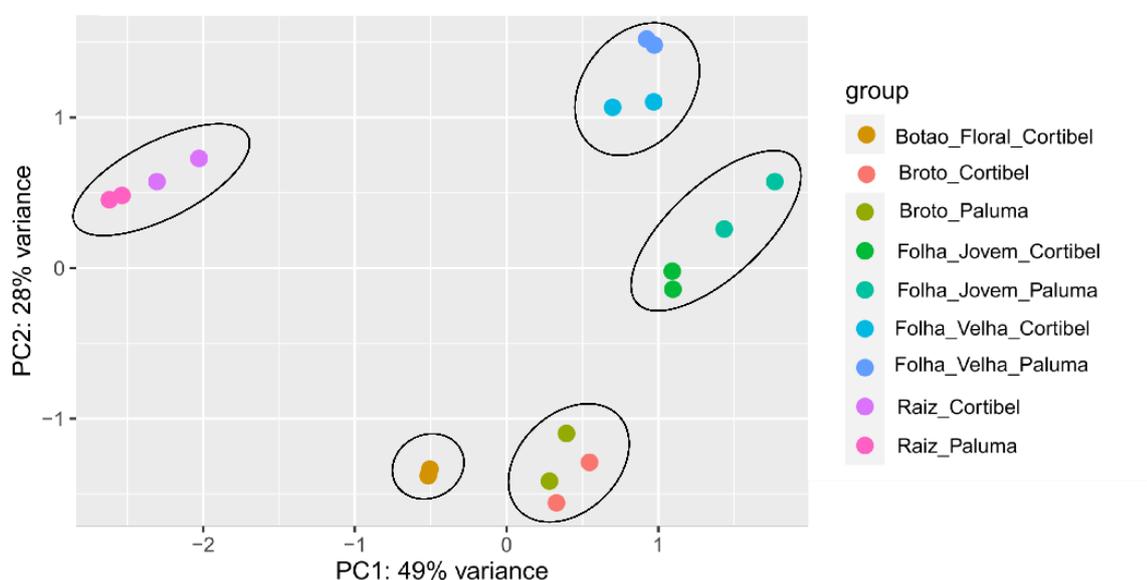


Figura 8: Análise de componentes principais (PCA) dos genes SnRKs contendo duas réplicas biológicas de diferentes tecidos, botão floral, broto, folha jovem, folha madura, de duas cultivares Cortibel RM e Paluma.

Na análise de abundância relativa dos 43 genes SnRKs nos diferentes tecidos das cultivares Paluma e Cortibel RM (Figura 9), verificou-se dois grupos. A maioria dos genes teve alta expressão em todos os tecidos. Um grupo de genes altamente expressos principalmente em tecidos de folha madura (exemplo: PgSnRK2.3, PgSnRK2.18, PgSnRK3.12) e outro grupo de genes com níveis de expressão medianos e diversificado entre os tecidos. Também é possível identificar a formação de *cluster* de genes com abundância aproximadas, com mudanças significativas quanto abundância dos genes

SnRKs em comparação os diferentes tecidos e entre os genótipos de estudo. Oito genes tiveram menor expressão, sendo os menos expressos em todos os tecidos os genes PgSnRK2.8 e PgSnRK2.12 e PgSnRK3.12. A análise dos genes com transcritos diferencialmente expressos em relação aos genótipos Paluma e Cortibel RM, evidencia a relação entre o perfil de expressão do mesmo tipo de tecido para os dois genótipos (Figura 12). Os tecidos de raiz e broto apresentaram perfis diferenciados em relação aos demais tecidos.

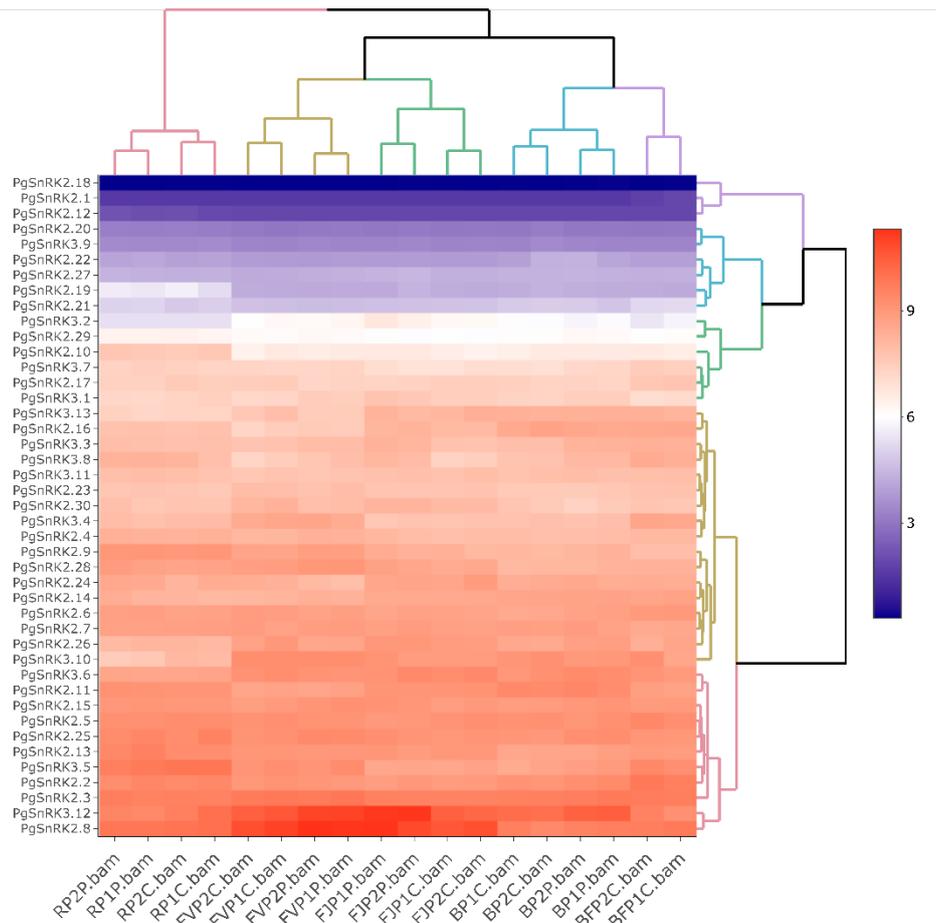


Figura 9: *Heatmap* da abundância relativa para cada gene PgSnRk em agrupamento hierárquico para os genes de diferentes bibliotecas dos genótipos Cortibel e Paluma. O sequenciamento de RNA foi realizado em duplicata a partir diferentes tecidos de dois genótipos de *Psidium guajava*. Esse heatmap descreve a abundância relativas de seqüências de genes atribuídas a cada tecido de cada cultivar (eixo y) em relação a cada gene PgSnRK identificado (eixo x). As cores do mapa de calor representam a abundância relativa, utilizando os valores de *reads counts* dos genes dentro de cada amostra, sendo a cor roxa os de maior abundância

No tecido de raiz em geral os genes superexpressos de Cortibel RM foram SnRK3, enquanto para Paluma SnRK2. O inverso ocorreu em tecidos foliares, nos quais em geral os superexpressos foram SnRK2 em Cortibel RM e SnRK3 em Paluma (Figura 10). O gene PgSnRK3.9 destacou-se nos tecidos clorofilados de Paluma e Cortibel. Enquanto PgSnRK2.31 e PgSnRK2.19 foram superexpressos tanto em raiz como em folha. No tecido de raiz, os transcritos que apresentaram expressão diferencial foram PgSnRK2.1, PgSnRK2.12, PgSnRK2.31 e PgSnRK2.32 (mais expressos na cultivar Paluma) e os genes PgSnRK2.15, PgSnRK3.2, PgSnRK3.10 e PgSnRK3.12 na cultivar Cortibel RM. No tecido de folha jovem os genes PgSnRK2.19, PgSnRK2.31 e PgSnRK2.9, tiveram maior expressão em Cortibel RM, enquanto os genes PgSnRK1.1, PgSnRK2.16, PgSnRK3.2, PgSnRK3.9 e PgSnRK3.13 na cultivar Paluma. Em folha madura, PgSnRK2.34, PgSnRK3.3, PgSnRK3.9 e PgSnRK3.13 foram mais expressos em Paluma e PgSnRK2.9, PgSnRK2.19, PgSnRK2.31 e em Cortibel RM. Em tecidos de broto, os genes PgSnRK2.15 e PgSnRK3.3 tiveram maior expressão em Paluma, e os PgSnRK2.19, PgSnRK2.30 e PgSnRK3.9 na cultivar Cortibel RM.

Sequências contendo variações em nucleotídeos denominadas STAGs, (19.537 sequências) obtidas de 62 genótipos de goiabeiras, incluindo Paluma e Cortibel RM, foram alinhadas com os genes SnRKs anotados. A presença e ausência da STAG, também foi considerado como polimorfismos, visando indicar polimorfismos no sítio de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas no preparo da biblioteca pela metodologia DArTseq (<https://www.diversityarrays.com/>). Houve alinhamento em oito genes dos 43 genes SnRKs, os quais permitiram estudar a variabilidade genética dos 62 genótipos com base no polimorfismo dos genes SnRKs. (Figura 11)

Baseado nos polimorfismos dos genes SnRKs quatro grupos de genótipos foram obtidos, um grupo contendo as cultivares Paluma e Pedro Sato, outro grupo contendo dois acessos do estado da Bahia, um terceiro grupo somente o acesso Negro 2 e uma grande grupo com todas as demais cultivares, incluindo os genótipos Cortibel. As cultivares Paluma e Cortibel RM apresentaram polimorfismos, nos genes PgSnrK2.7, PgSnrK2.14, PgSnrK3.6 e PgSnrK3.10, este último foi um dos superexpressos em raiz no genótipo Paluma.

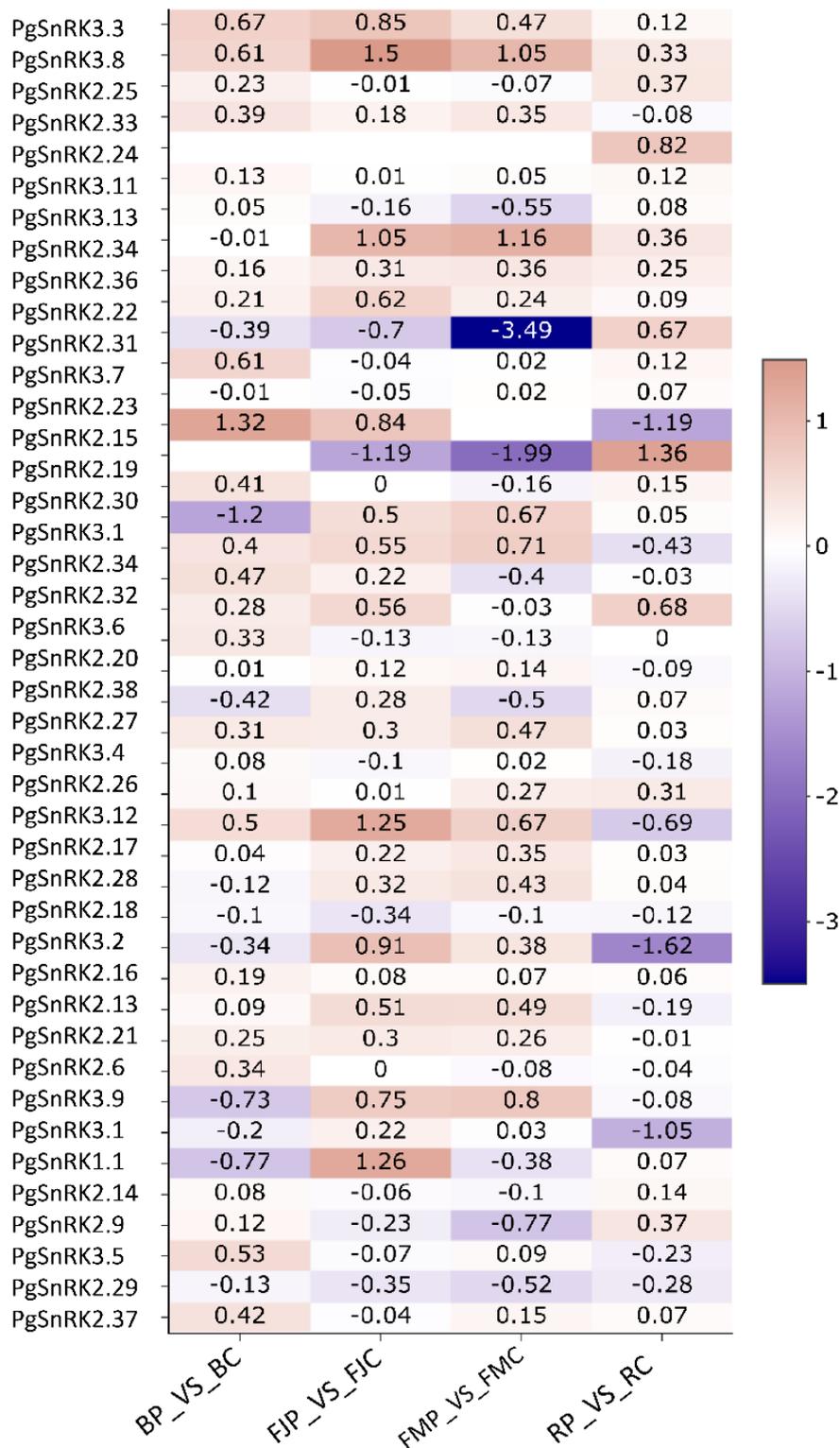


Figura 10. Heatmap dos transcritos diferencialmente expressos para cada tecido. Cada amostra é resultado da média entre as duplicatas biológicas. Esse heatmap descreve o agrupamento entre os perfis de expressão diferencial, nos quais foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com variação de expressão superior a 1,5 (*fold-change*) entre amostras, com significância estatística (*p-value*) menor que 0,05%. Em azul representa genes com expressão diferencial para a cultivar Cortibel RM, enquanto a cor marrom é referente a genes com maior expressão na cultivar Paluma.

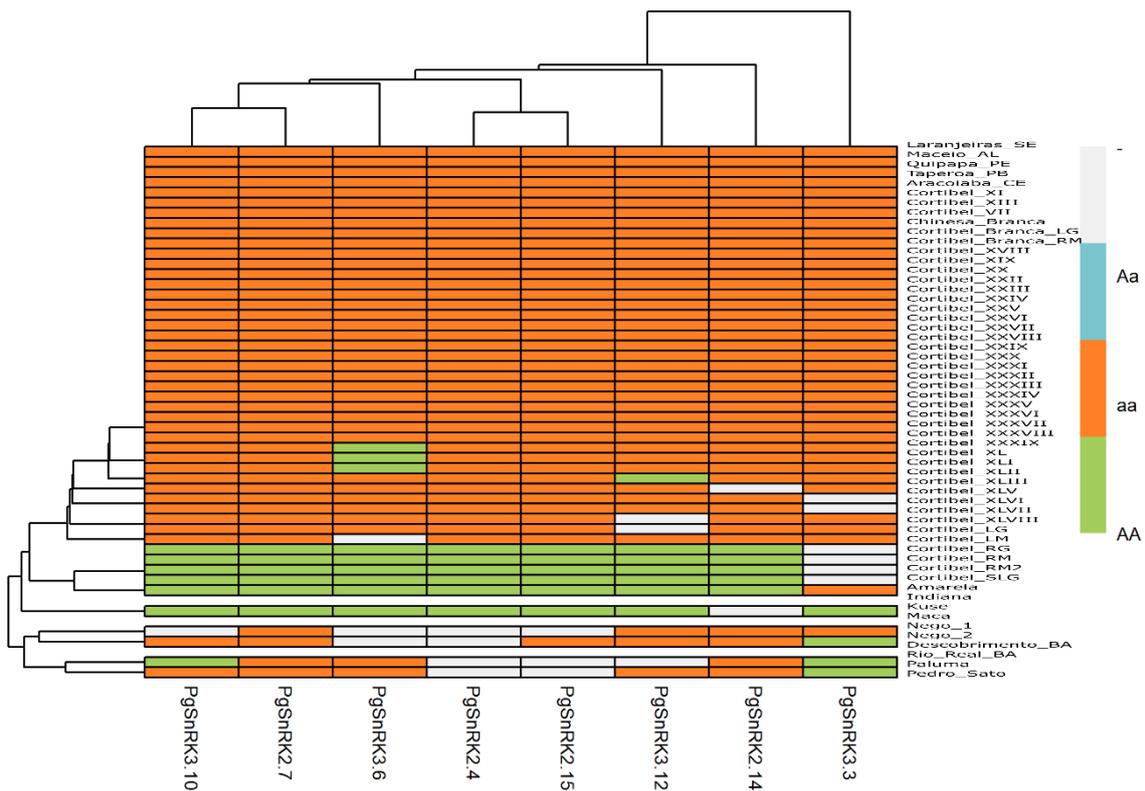


Figura 11: *Heatmap* dos genótipos de goiabeiras e polimorfismos de genes de SnRKs amostrados. Representação na cor verde = homocigoto do alelo de referência; cor laranja = homocigoto do SNP; cor azul = heterocigoto, cor cinza = ausência da STAG na representação genômica

4.4. Discussão

A família de genes SnRKs desempenha um papel importante na resposta ao estresse em plantas. O estudo desta família ainda é restrito a espécies vegetais de grande importância como *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Gossypium* e *E. grandis*. *Psidium guajava*, é uma espécie de ampla distribuição, de ocorrência em condições adversas, e que o cultivo comercial é amplamente afetado pela salinidade no Brasil, ainda não teve esta família de genes caracterizada. Neste estudo, foram anotados 29 membros da família SnRK, incluindo 2 genes SnRK1, 14 genes SnRK2 e 13 genes SnRK3. Adicionalmente foi detectado 24 genes exclusivos de SnRK2 no draft das cultivares brasileiras. Diante de família destes genes para outras espécies vegetais, observou-se uma expansão da subfamília de SnRK 2 e retração da subfamília SnRK3.

A família SnRK é conservada em todos os eucariotos, com SnRK1, funcionando como um sensor de célula em estado energético (HALFORD et al., 2004; LI et al., 2010;

NUKARINEN et al., 2016). Nas plantas, esta família evoluiu para mais duas subfamílias, SnRK2 e SnRK3, que são proteínas de grande importância em mecanismos de resposta ao estresse dependentes e independentes de ABA (COELLO; HEY; HALFORD, 2011; FUJII; VERSLUES; ZHU, 2011; ZHANG et al., 2010). A busca desses genes no genoma de *P. guajava*, por homologia, permitiu a definição de um grande número de genes candidatos, a maioria deles apenas homólogos ao domínio Pkinase, sendo, portanto, classificados com SnRK 2.

Como forma de avaliar todos os resultados do BLAST foram posteriormente curados por análises do domínio das proteínas. Esta estratégia foi posteriormente expandida para uma busca no genoma baseada em domínio à procura de sequências contendo todos os domínios necessários para uma proteína ser classificada como SnRK. Isso provou ser útil, permitindo a incorporação de outras proteínas SnRK, este processo também demonstrou eficácia em outras espécies (COLINA et al., 2019). Nas análises genômicas realizadas duas proteínas pertencentes a subfamília PgSnRK1 foram descritas com a presença dos domínios característicos altamente conservados na evolução (HARDIE, 2007), outros resultados similares quanto ao número de genes pertencentes a essa subfamília também foram relatados incluindo em espécies pertencentes a mesma família de, *E. grandis* (WANG et al., 2019).

Estudos em *A. thaliana* mostraram que a subfamília SnRK2 pode ser dividida em 3 grupos: o grupo 1 compreende quinases não ativadas por ABA; o grupo 2, não ativadas ou ativadas muito fracamente por ABA (dependendo da espécie de planta); e grupo 3, fortemente ativado por ABA (KULIK et al., 2011). Com base nos dados apresentados nesse trabalho e como mostrado por Kulik et al. (2011), podemos dividir a subfamília PgSnRk2 como pertencentes ao grupo 1, os genes PgSnRk2.2, PgSnRk2.4 e PgSnRk2.7; ao grupo 2, PgSnRk2.1, PgSnRk2.3 e PgSnRk2.6; e ao grupo 3, PgSnRk2.5 e PgSnRk2.8. Em *E. grandis* e espécies modelos como *A. thaliana* e *Zea mays*, observou-se quantidade de sequências de proteínas para essa subfamília SnRK2, mais próximas às encontradas no genoma de referência, com oito, dez e dez respectivamente (HRABAK et al., 2003; HUAI et al., 2008; WANG et al., 2019).

Entretanto, os genes SnRK2 que formaram um clado exclusivo para *P. guajava*, promovendo o aumento do número de proteínas classificadas nesta subfamília. Nesses genes as análises de motivos conservados mostraram que tanto os genes SnRK2 do genoma de referência quanto os descritos no draft das cultivares brasileiras, apresentaram

perda na quantidade de motivos, as análises mostram redução de tamanho de motivos e quantidade quando visto das proteínas PgSnRk2.9 até a PgSnRK2.38. Também nas análises filogenéticas ainda realizadas com os dados dos dois genomas sugerem que esses grupos de SnRK2 tem proximidade com os grupos de SnRK3 em *P. guajava*, nas quais pode ser percebido uma redução dessa subfamília na espécie, diferente de modelos com *A. thaliana* e *E. grandis* na qual possuem 25 e 24 respectivamente de proteínas SnRK3. (HRABAK et al., 2003; WANG et al., 2019). É razoável ainda levar em consideração que por ser a montagem inicial de um genoma e o primeiro genoma publicado da espécie, a fragmentação de sequências gênicas é comum, o que pode ter levado a fragmentação destes genes. Esses grupos de SnRK2 podem ser na verdade proteínas SnRK3 fragmentadas durante a montagem do genoma, a presença de motivos extremamente reduzidos, quanto ao número de resíduos de aminoácidos, nesses representantes pode estar relacionada com a fragmentação dessas sequências. A presença de um único domínio, o Pkinase, na subfamília SnRK2 (KULIK et al., 2011), pode dificultar a identificação dos genes pertencentes a mesma, dado que é comum a presença desse domínio catalítico em outros grupos de proteínas; assim esses genes fragmentados que mantiveram em sua estrutura somente esse domínio pode ter sido classificado como SnRK2 neste trabalho.

Em famílias de genes SnRK de *A. thaliana* e *P. guajava*, diferentes genes de subfamília exibiram comprimento de gene e estruturas de éxon-íntron bastante divergentes. Alguns estudos demonstraram que genes com menor quantidade de íntrons apresentaram maiores níveis de expressão em plantas (CHUNG et al., 2006; JEFFARES; PENKETT; BÄHLER, 2008). Uma estrutura compacta do gene, com menor número de íntrons permite a rápida ativação do gene e resposta oportuna a diversos estresses ambientais (JEFFARES; PENKETT; BÄHLER, 2008). No entanto, combinado com os dados do transcriptoma usados neste estudo, não detectamos que os genes PgSnRK com menor quantidade de íntrons apresentaram maiores níveis de expressão. Outros estudos, no entanto, também realizados em diferentes tecidos de plantas, para os genes SnRKs sugerem que o níveis de expressão não apresentaram relação com a quantidade de éxons e íntrons dos mesmos (ZHU et al., 2020).

4.5. Conclusão

A anotação e a caracterização da família de genes SnRks em goiabeira trazem novas perspectivas para os estudos de tolerância ao estresse salino na espécie. O trabalho apresenta informações importantes para análises desses genes com a estrutura genica, além de suas localizações cromossômica. O trabalho compara a identificação desses genes no genoma de referência e no *draft* de duas cultivares brasileiras indicando uma possível expansão da subfamília SnRK2 na espécie e uma redução da SnRK3. Os estudos de transcriptômica apresentaram que existe expressão diversificada desses genes tanto relacionadas aos tecidos quanto nos genótipos que foram estudados. Ainda é possível visualizar que existe variações nas sequencias desses genes, SNPs, germoplasma brasileiro evidenciado ainda mais nas cultivares Paluma e Cortibel RM, que foram mais caracterizadas nesse trabalho.

Este estudo forneceu um conhecimento abrangente de família de genes SnRK em *P. guajava*, auxiliando para uma maior compreensão das funções biológicas de genes SnRK individuais em *P. guajava*. Por outro lado outros estudos para validação funcional dos mesmos podem ser feitos em trabalhos posteriores para compreender o papel da família PgSnRK em relação a tolerância a estresse abióticos.

5. CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTO PARA ESTRESSE SALINO EM GOIABEIRA

5.1 Introdução

Regiões tropicais e subtropicais normalmente são caracterizadas pela presença de territórios áridos e semiárido que possuem alto processo de evaporação da água superficial do solo, esses e outros fatores como baixa precipitação pluvial, depleção das águas subterrâneas além de inadequadas práticas agrícolas podem favorecer processos de salinização. Estima-se que nos próximos 25 anos cerca de 30% da área cultivada no mundo esteja afetada pela salinidade (CHAND et al., 2019). Por outro lado áreas com esse clima apresenta grande potencial para o cultivo de plantas frutíferas, entre elas a goiabeira, em áreas irrigadas, porém, muitas vezes estas áreas apresentam tendência para o acúmulo de sais (FERREIRA; TÁVORA; HERNANDEZ, 2001).

Como principais fatores abióticos limitantes da produção estão o déficit hídrico e a salinidade, condições com maior impacto na região nas áreas irrigadas do semiárido do Nordeste, onde a goiabeira está entre as três principais fruteiras cultivadas e exploradas comercialmente. Nesta região, a irrigação é uma das tecnologias que mais contribuem para garantir a atividade agrícola devido aos períodos prolongados de estiagens, nos quais ocorrem déficit hídrico nas plantas. Entretanto, a indisponibilidade de água de boa qualidade para irrigação é limitada e o uso de água salina na irrigação é uma alternativa para suprir a demanda hídrica das culturas (SILVA, 2015).

A tolerância à salinidade é uma resposta complexa, baseada no resultado de vários mecanismos que dependem de interações morfológicas, fisiológicas, e moleculares na planta. Continuamente, as plantas desenvolveram diversas estratégias adaptativas, como regulação hormonal, alteração redox e controle epigenético de genes relacionados ao estresse. Da mesma forma, na tolerância ao estresse salino, a planta coordena complexa via de sinalização, que incluem sensores de reconhecimento de estresse, proteínas, transdutores de sinalização, fatores de transcrição, genes e metabolismo responsivo ao estresse (ZHU, 2002).

Para a cultura da goiabeira, estudos com a cultivar Rica demonstraram que o estresse salino reduziu a matéria seca total demonstrando que a relação parte aérea/raiz foi reduzida com a presença do agente estressor, além do aumento nos níveis dos íons Na^+ e

Cl⁻, com maior acúmulo nas folhas, seguido das raízes. Os teores de Ca²⁺ foram estáveis nas raízes, mas decresceram no caule e folhas. Os teores de K⁺ foram reduzidos, particularmente nas folhas. Ao contrário, os teores de Mg²⁺ não foram afetados pela salinidade no caule e nas raízes, havendo, entretanto, redução nas folhas. O teor de Na⁺ apresentou relação direta com o de Cl⁻ e inversa com o de K⁺ nas raízes e folhas. O teor de Ca²⁺ não variou com o de Na⁺ nas folhas, mas apresentou uma relação inversa nas raízes. O teor de Mg²⁺ não variou com o de Na⁺ nas raízes e folhas (FERREIRA; TÁVORA; HERNANDEZ, 2001).

Estudos que auxiliam na identificação de genótipos e caracteres que contribuem para a tolerância ao estresse salino são importantes para o desenvolvimento de cultivares tolerantes. Obter respostas preliminares relacionadas aos estresses relacionados aos aspectos morfológicos são os primeiros indicativos para delimitação de futuras estratégias de estudo. O presente estudo busca elucidar os aspectos e as respostas morfológicas de raízes de mudas de diferentes cultivares de goiabeira, previamente avaliadas para tolerância a salinidade por análises de sementes, visando padronização de condições experimentais para estudo de tolerância a este estresse na cultura.

5.2. Metodologia

5.2.1. Material vegetal

Para o experimento de respostas a tolerância aos estresses salino em *P. guajava* foram utilizadas mudas obtidas por propagação vegetativa com aproximadamente 90 dias, do viveiro Frucafé registrado no Ministério da Agricultura. As mudas foram selecionadas quanto à uniformidade de altura, diâmetro e condição fitossanitária, e apenas plantas saudáveis foram utilizadas. De acordo com os resultados prévios de genótipos de goiabeira sob estresse salino obtidos por (DALVI, 2012) utilizou-se os genótipos Cortibel RM, (C6) e Cortibel LG (C1) (tolerante ao estresse salino) e da cultivar Paluma (sensível ao estresse salino). O genótipo Cortibel RG (C14) também foi utilizado, embora sem dados referentes ao estresse salino, porém de alta produtividade. Alguns resultados obtidos para estes genótipos previamente pelo grupo de pesquisa da UFES estão listados na Tabela 2.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação em sistema de hidroponia com recipientes contendo 10 litros de solução nutritiva contendo fosfato de potássio, nitrato de potássio, sulfato de magnésio e nitrato de cálcio (FURLANI, 1998), com aeração constante. As mudas inicialmente foram colocadas para aclimatar por 10 dias em solução nutritiva e posteriormente submetidas ao estresse salino a concentrações de sal foram testadas com base em espécies já testadas como descrito por Wang et al., 2019. o experimento teve início no 27 de março de 2020, com duração total de 34 dias levando em consideração o período de aclimação.

Tabela 2: Características dos genótipos estudados obtidos em estudos prévios do grupo de pesquisa da UFES.

Característica	Genótipos			
	LG	RM	RG	PALUMA
Abortamento de Flor ²	S	S	S	S
Percevejo ²	S	S	S	S
Estresse Salino ¹	T	T	NE	S
Doenças pós-colheita ²	R	S	S	S
Ferrugem ²	R	R	S	S
Infestação de psilídeo ²	R	S	S	S
Número de frutos ²	ME	ME	MA	MA

Legenda: Sensível = S; Tolerante = T; Resistente = R; Não Estudado = NE; Maior = MA; Menor = ME.

1- (DALVI, 2012); 2 - (SILVA, 2017).

5.2.2. Experimento de Estresse Salino

No experimento utilizou-se quatro genótipos de goiabeira (Cortibel RM, Cortibel LG, Cortibel RG e Paluma) em tratamentos com 100mM e 200mM de NaCl e o controle sem tratamento (somente com solução nutritiva). Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições por genótipo (Figura 12). Após 10 dias de aclimação em solução nutritiva, as plantas tratadas foram submetidas ao estresse salino por 14 dias em solução nutritiva com adição dos tratamentos com as concentrações de sal. Posteriormente, a solução salina foi removida e substituída por nova solução nutritiva, onde as mudas permaneceram por mais 10 dias para recuperação. Após esse período, as plantas foram retiradas da solução nutritiva, lavadas e obtidas a massa úmida de raiz e comprimento radicular. Posteriormente, as raízes foram secas em estufa a 60°C por 48 horas onde a massa seca foi obtida. Os dados coletados foram analisados mediante análise

de variância e normalidade (Shapiro-Wilk) e posterior teste de Tukey ($\alpha= 0,05$) no software R (Team, 2011).



Figura 12: Visão geral do experimento em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado. **A** e **B** genótipos distribuídos em fileiras, totalizando seis repetições por genótipo. **C** e **D** distribuição total do experimento com controle negativo e tratamentos com 100 mM e 200mM de NaCl.

5.2.3. Obtenção do RNA Total e Parâmetros de Qualidade

A concentração, qualidade e a integridade do RNA foliar obtido dos genótipos submetidas ao estresse salino e controle foram analisadas. Após sete dias de exposição ao estresse com as duas concentrações de NaCl e o controle negativo as amostras foram coletadas contendo duas amostras de porções equivalentes de tecido de 3 indivíduos cada amostra foi coletada contendo 3 repetições com o mesmo tecido e planta totalizando seis amostras por genótipo. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até a extração. A coleta foi realizada utilizando folha jovens já desenvolvidas (segundo ou terceiro par de folha). Para o isolamento do RNA total 80 ~100 mg de material foliar foram pulverizados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, a extração de RNA foi realizada por

protocolo baseado em CTAB como descrito por Guzman et al., 2014 com as modificações: 900 µL de tampão extração aquecido a 65°C (CTAB a 5%, PVP-40 2% (p/v), NaCl 2M, Tris-HCl pH 8,0, 100mM EDTA pH 8,0 25mM), e incubado a 65 °C por 10 minutos, com posterior adição de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1, v/v), foi centrifugar a 7000 g durante 20 min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1, v/v) e posteriormente centrifugada a 7000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado metade do volume total da amostra com LiCl 4 M, e incubado a -20°C por 4 horas. Após a incubação foi feita uma nova centrifugação a 16.000 g durante 30 min a 4°C, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol a 75% gelado e centrifugar a 16.000 g durante 10 min a 4°C, posteriormente o *pellet* será ressuscitado em 30 µL de água ultrapura e armazenado a -80°C. A pureza e a concentração do RNA foram avaliadas pela determinação da absorvância de RNA em água livre de RNase em 230, 260 e 280nm, usando um NanoDrop ND-1000 espectrofotômetro (Thermo Scientific, EUA). O rendimento de RNA foi calculado com base em absorvância a 260nm (A_{260}). As razões A_{260} / A_{280} e A_{260} / A_{230} foram medidas para avaliar a pureza de RNA. A integridade do RNA foi avaliada a partir das bandas de rRNA 28S e 18S em 1,0% (w / v) gel de formaldeído-agarose após eletroforese, coloração com 1: 20.000 GelRed® (Biotium) e visualização com o Sistema Gel Doc XR + (Bio-Rad, EUA).

5.2.4. Síntese de cDNA:

As amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) contendo de 1-8 µl de RNA, 1 µl RQ1 RNase-Free DNase reaction buffer, 1u/µg de RQ1 RNase-Free DNase, e água Nuclease-free para o volume de 10 µl e incubadas a 37°C por 30 minutos, posteriormente adicionado 1µl de RQ1 DNase stop solution e incubado por 10 min a 65°C.

A síntese de cDNA foi realizado usando o RNA extraído utilizando M – MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as instruções disponibilizadas pelo fabricante, sendo utilizado 3000ng de RNA total e 200U/µL de Reverse Transcriptase. A reação de síntese foi realizada utilizando 1µl de random hexamers (50ng/µl), 1µl de dNTP mix (0.1 M) e os 11 µl das amostras de RNA tratadas com DNase, o RNA primer mix foi incubado a 65°C por 5 minutos, posteriormente adicionado mix contendo 4µl de First-Strand Buffer 5X, 2µl de DTT (100mM), 1µl de RnaseOUT™ (40 U/µL) e incubada

37°C por 3 minutos e posteriormente adicionado 1µl de M-MLV Reverse transcriptase (200U/µl), a reação foi incubada a 23°C por 10 minutos , posteriormente incubadas a 37°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos.

5.2.5. Amplificação por RTq-PCR:

Como forma de verificar a eficiência dos métodos de extração e integridade do RNA extraídos foi realizado PCR quantitativo em tempo real. As reações qRT-PCR foram realizadas em reações de 10 µL sendo 2 µl de cDNA e 5µl de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (appliedbiosystems). Para todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em equipamento LightCycler® 96 (Rocher) utilizado 3 µl (400 nM) de primer acrescido de cDNA e o Master Mix. A amplificação foi realizada utilizando primer correspondente a histona H2A: forward: AAGCCGGTCTCTCGGTCTGT, reverse: GCATTACCAGCCAACTCCAG, previamente analisado quanto a sua eficiência (Apêndice 3) seguindo o padrão de amplificação com uma primeira incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos (Hot start para ativação da enzima Taq polimerase), e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos 60°C por 1 minuto, ao final dos 40 ciclos foi realizado Melt curve com 50°-95°C incremento 0,5°C for 10segundos.

5.3. Resultados

O estresse salino causou redução do crescimento da raiz ou morte das plantas de goiabeiras tratadas. A maioria das plantas morreram com o tratamento com 200 mM de NaCl, restando somente duas plantas vivas do genótipo Paluma ao final do experimento. No tratamento com 100 mM de NaCl, para a cultivar RM houve morte de um indivíduo após a recuperação, para Paluma dois e para as cultivares LG e RG, quatro.

Quanto aos aspectos morfológicos a massa úmida de raiz foi mais afetada pelos tratamentos quando analisadas de todas as cultivares em conjunto evidenciando a perda de água das raízes na presença da solução de NaCl, os resultados de massa seca apresentaram diferença significativas somente na concentração de 200 mM de NaCl. As cultivares diferiram, quanto à massa fresca e seca de raiz. A cultivar RM apresentou maior massa em ambas as situações, seguida pela cultivar RG e Paluma, que apresentaram resultados semelhantes. A cultivar LG foi a cultivar apresentou os menor massa de raiz e volume.

Quando analisados de forma independente para cada cultivar somente a cultivar Cortibel RG mostrou redução significativa de massa úmida em comparação ao controle na concentração de 100mM de NaCl, nessa mesma concentração as cultivares Cortibel RG e Cortibel RM também mostraram redução na massa seca, a cultivar Paluma não apresentou alterações na concentração de 100mM de NaCl. Na concentração de 200 mM de NaCl todos as cultivares tiveram redução tanto de massa unida quanto de massa seca, porem como a morte dos indivíduos nessa condição foi bastante acentuada pode ter influenciando na perda de água das raízes, e consequentemente afetando os resultados.

Quanto ao comprimento de raiz, todas as cultivares apresentaram resultados semelhantes estatisticamente entre as cultivares. Entretanto, essa variável compara principalmente a raiz principal e as maiores diferenças apresentadas são referentes às raízes secundárias e terciárias, destacado na Figura 13 (5 – 8). Nessas análises, fica evidente que a cultivar LG possui menor quantidade de raízes em relação às demais, corroborado pelas massas secas e frescas. A cultivar LG também apresentou maior número de indivíduos com morte. As cultivares RM e Paluma apresentaram maior número de indivíduos vivos, seguidos pela cultivar RG.



Figura 13: Observação das cultivares Cortibel RM, Cortibel RG, Paluma e Cortibel LG, 1 – 4 respectivamente, após 14 dias de exposição a concentração de 100mM de NaCl e 10 dias de recuperação, nota-se que a cultivar LG foi a mais afetada pela salinidade, com perda total das folhas. Os indivíduos mostrados de 5 – 8 são as cultivares Cortibel RM, Cortibel RG, Paluma e Cortibel LG pertencentes ao controle, sem adição de NaCl

Para estudos de expressão genica a qualidade e a integridade do RNA é de extrema importância. A integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1%. Na Figura 14 é possível visualizar todas as seis réplicas extraídas para cada cultivar no Controle, e nos tratamentos com 100mM e 200mM de NaCl. No gel é possível visualizar que as amostras de RNA se apresentaram integras em todas as condições do estudo, visualizadas pelas bandas de rRNA. A qualidade e pureza das amostras de RNA extraídas foram avaliadas por espectrofotômetro do tipo Nanodrop, a razão A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} (Tabela 3) e não houve alterações significativas entre as amostras. Quanto a concentração de RNA (Tabela 3) ocorreu redução da quantidade de RNA extraído nas amostras tratadas quando comparadas com o controle nas cultivares Paluma, Cortibel LG e Cortibel RG, entretanto essa redução não pode ser observada na cultivar Cortibel RM.

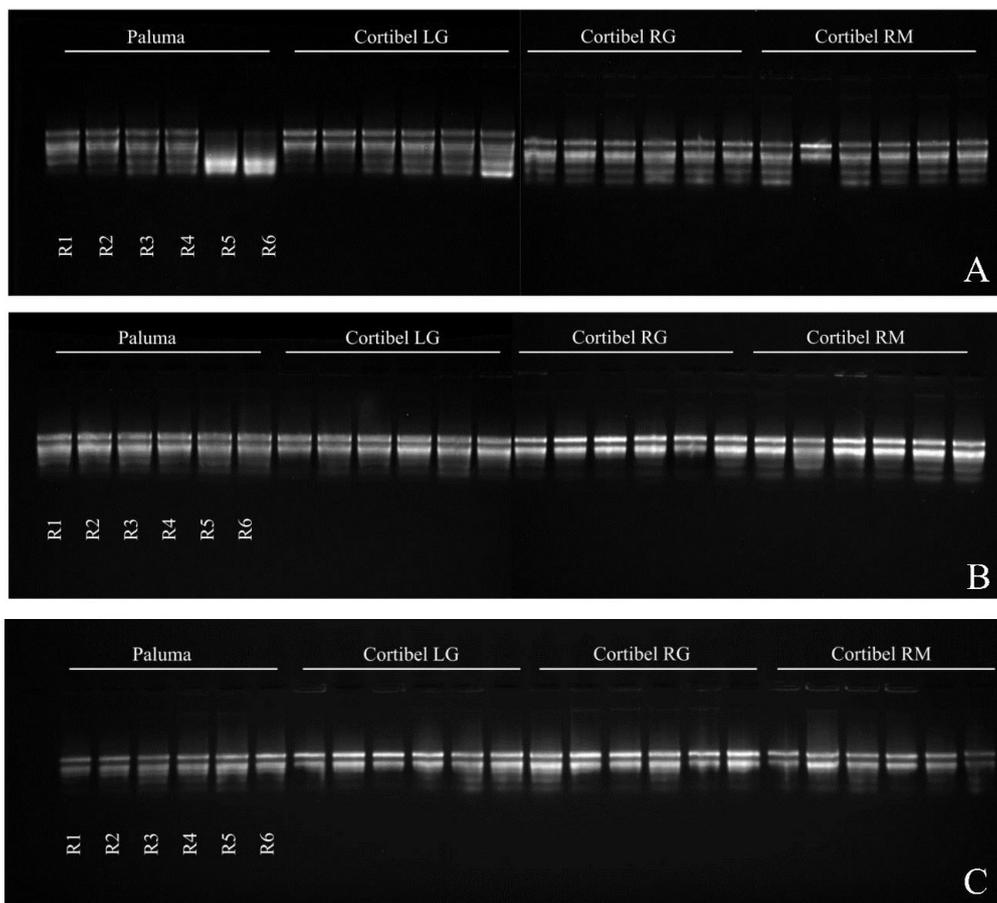


Figura 14: Integridade de RNA extraídos de folhas das cultivares Paluma, Cortibel LG, Cortibel RG e Cortibel RM submetidas a estresse por sal, em gel formaldeído-agarose (1%) de integridade. **A** – Plantas controle 0mM de NaCl. **B**- Plantas submetidas a 100mM de NaCl. **C**- Plantas submetidas a 200mM de NaCl. Estão representas 6 réplicas por cultivar em todos os tratamentos

Tabela 3: Análise de rendimento e pureza de RNA para folhas estressadas por diferentes concentrações de solução de NaCl de diferentes genótipos de *P. guajava*

	Genótipos	n	Concentração (ng/uL)	Razão A_{260}/A_{280}	Razão A_{260}/A_{230}
Controle	Paluma	6	613,40 ± 112,19	2,25 ± 0,07	2,40 ± 0,23
	Cortibel LG	6	765,21 ± 327,25	2,22 ± 0,02	2,37 ± 0,05
	Cortibel RG	6	617,021 ± 51,34	2,21 ± 0,02	2,36 ± 0,01
	Cortibel RM	6	610,43 ± 169,17	2,19 ± 0,03	2,34 ± 0,06
100 mM	Paluma	6	603,50 ± 57,29	2,15 ± 0,01	2,33 ± 0,06
	Cortibel LG	6	644,72 ± 112,81	2,38 ± 0,03	2,38 ± 0,06
	Cortibel RG	6	553,51 ± 152,72	2,16 ± 0,02	2,41 ± 0,03
	Cortibel RM	6	711,30 ± 102,62	2,18 ± 0,02	2,32 ± 0,05
200 mM	Paluma	6	572,86 ± 90,23	2,20 ± 0,03	2,38 ± 0,04
	Cortibel LG	6	493,85 ± 174,97	2,20 ± 0,02	2,39 ± 0,06
	Cortibel RG	6	635,19 ± 343,41	2,19 ± 0,03	2,32 ± 0,12
	Cortibel RM	6	693,77 ± 147,95	2,20 ± 0,03	2,33 ± 0,09

Como forma de verificar a qualidade das amostras de RNA extraídos do experimento de estresse para aplicações em biologia molecular, foram também avaliadas por RTq-PCR. Todas as amostras avaliadas mostraram uma amplificação característica (curva de amplificação) e curva e picos únicos na análise de dissociação (curva de Melting) (Figura 15).

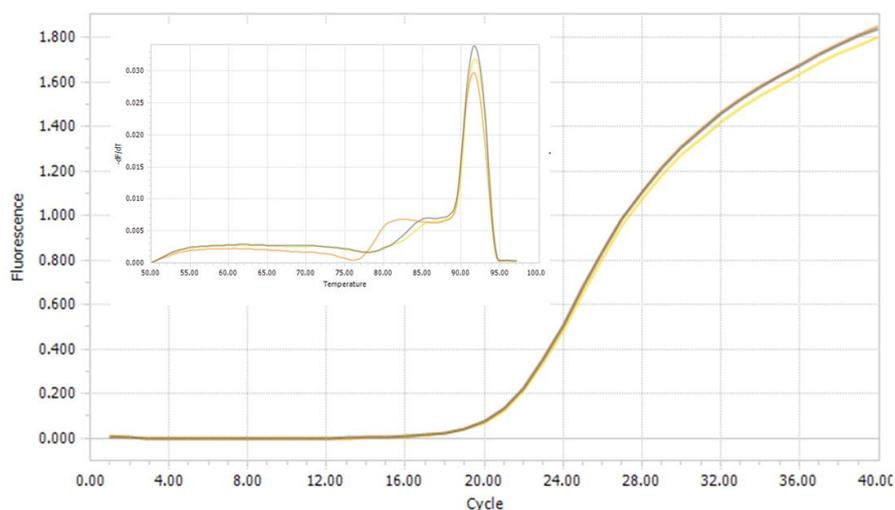


Figura 15: Verificação de qualidade do cDNA de Amostras extraídas por amplificação do gene histona H2A usando SYBR® Green RTq-PCR e curva de fusão mostrando produtos de amplificação específicos.

5.4. Discussão

A tolerância ao sal pode estar intimamente relacionada à capacidade das plantas de eliminar o cloreto. Entretanto, não há evidências de que a separação do íon cloro nos vacúolos ou na redistribuição no tecido de plantas lenhosas ocorra na salinidade (STOREY; WALKER, 1998). A adaptação à salinidade está principalmente associada à redução da captação de cloreto ou transporte do mesmo, inicialmente sugerido que a absorção de cloreto estava relacionada ao hábito de crescimento e ao tamanho e morfologia do sistema radicular (ALTMAN; MENDEL, 1973). Em estudo realizado por Storey (1995) em citros, observou-se que o desenvolvimento da raiz mudou a capacidade de excluir o cloreto. Portanto, a capacidade de excluir cloreto (fator necessário para a tolerância ao sal) dos ramos é principalmente afetada pelas propriedades físicas da estrutura da raiz. Neste trabalho, o genótipo Cortibel LG, foi o mais afetado e também redução na concentração de RNA total. Entretanto mesmo sendo o genótipo com menor tamanho radicular, não foi observado alterações significativas quando comparada o peso de massa unida e massa seca na concentração de 100 mM. Aparentemente a relação de da estrutura de raiz pouco desenvolvida, por estar em menor estágio de desenvolvimento relação aos demais genótipos em estudo pode ter influenciado. Para esta cultivar, no entanto, em indivíduos adultos e produtivos em campo sem irrigação, foi a única que produziu frutos em condições de longa estiagem (dados observados pelo grupo de pesquisa), sugerindo que o estágio de desenvolvimento da raiz pode mostrar diferentes respostas quanto a salinidade em cada uma das cultivar.

O estresse salino induz a síntese de ABA, que fecha os estômatos quando transportado para as células-guarda. Como resultado do fechamento dos estômatos, a fotossíntese é reduzida, ocorrendo fotoinibição e estresse oxidativo. O efeito direto do estresse osmótico no crescimento da planta é inibir direta ou indiretamente a expansão celular por meio do ácido abscísico, quanto maior a exposição a salinidade maior o dano que pode ser gerado (STOREY 1995), podendo indicar uma relação com à maior redução de massa seca e fresca de raiz, morte de plantas e redução na concentração de RNA total no tratamento com 200 mM de NaCl observada no estudo, sugerindo que a redução da massa seca ser menos intensa entre tratamentos, que diferenças na massa fresca esteja relacionado a diferenças na quantidade de água presente no tecido das raízes.

Estudos sobre a distribuição de matéria seca de goiabeira desenvolvida com a cultivar Rica, mostrou ainda uma forte relação entre a matéria seca de raiz em relação a área foliar, a perda de matéria seca em folhas é ainda maior que em relação a das raízes de 10 a 20% superior, essa redução pode sugerir que os íons absorvidos pelas raízes e transportados para a parte aérea possivelmente excederam o limite necessário ao ajustamento osmótico da planta, e desta forma acarretaram efeitos danosos ao crescimento (FERREIRA; TÁVORA; HERNANDEZ, 2001). Indicado também pela redução na concentração de RNA presente no genótipo mais afetado.

Os resultados observados neste trabalho diferem dos relatos em estudos prévios realizados em germinação de sementes (DALVI, 2012), realizado com a maioria dos genótipos, no qual relata que o genótipo Paluma, Cortibel RM e Cortibel LG apresentaram tolerância ao estresse salino na germinação, no entanto, é razoável considerar que os mecanismos adaptativos em plântula com sistema radicular já desenvolvido é diverso do processo inicial de germinação, e que para o caso da goiabeira as plantas utilizadas em pomares comerciais são de origem de propagação vegetativa. Ainda é preciso investigar se os mesmos genótipos com sistema radicular completamente desenvolvidos, apresentarão diferentes respostas de tolerância a salinidade dos que aqui representados, o que impactaria na implantação de diferentes tipos de manejo quanto ao estresse salino em goiabeiras.

Embora não tenha ocorrido significativas alterações quanto à integridade e qualidade do RNA isolado das amostras sob estresse salino em relação ao controle, houve redução no rendimento de RNA extraído na cultivar Cortibel LG, a mais afetada. O tratamento com sal poder induzir degradação de ácidos nucleicos como resultado do gatilho de morte celular que poderia ser visto com a degradação das bandas de rRNA, bem como mudança no conteúdo químico da célula o que pode afetar a eficiência dos método de extração (BEHNAM et al., 2019; MEHER et al., 2018), as análises não mostraram processo de degradação de RNA porem a redução da concentração de RNA extraído na cultivar Cortibel LG pode ter sido afetada pela composição química da célula, sendo indicativos de investigação em estudos futuros. Outras substâncias como polifenóis e polissacarídeos inerentes à amostra de RNA podem co-precipitar com o mesmo e influenciar nas aplicações a jusante como estudos de expressão genica e biologia molecular (OPEL; CHUNG; MCCORD, 2010; ROSSEN et al., 1992; WILSON, 1997), porem os dados

apresentados nesse trabalho demonstraram que sua qualidade é adequada para esses estudos.

5.5. Conclusão

O presente trabalho apresentou evidências que a estrutura radicular das mudas de goiabeira amostradas pode influenciar na sua capacidade de se adaptar a ambientes com altas concentração de sal, observando que cultivares como Paluma e Cortibel RM, apresentaram respostas similares, a tolerância e que embora algumas plantas da cultivar Paluma tenham sobrevivido a altas concentrações de sal no tempo de tratamento, a cultivar Cortibel RM foi mais tolerante ao mesmo tratamento. As duas cultivares apresentaram o sistema radicular mais vigoroso sob tratamento. Por outro lado, as respostas de tolerância ao sal na espécie são pouco relatadas, e estudos futuros como de expressão genica, de respostas bioquímicas e fisiológicas na espécie, podem auxiliar a elucidar as respostas observadas nessas cultivares.

O experimento conduzido neste trabalho, mostrou que o sistema de hidroponia foi eficiente, porém indica que o uso de mudas com o mesmo estágio de desenvolvimento, e condição de crescimento radicular é necessário para esclarecer se o genótipo Cortibel LG, terá uma resposta a salinidade mais eficiente que as demais cultivares, conforme inicialmente indicado por análise visual em campo. Os demais estudos realizados, indicaram também que o RNA extraído dos indivíduos possui qualidade para estudos de biologia molecular.

Outro indicativo é que mudas de diferentes genótipos, da mesma idade, não necessariamente estão no mesmo estágio de desenvolvimento e nem possuem a mesma condição de estrutura radicular, sendo estas condições inerentes aos genótipos, fato que gera implicações no manejo para o estabelecimento das mudas em campo, em condições estresses abióticos, dado que a implantação de pomar é uma grande limitação na cultura pelo custo das mudas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises genômicas para caracterização de sequências gênicas que respondem a diferentes fatores bióticos e abióticos é crescente ao longo dos anos. A goiabeira ainda carece de informações genômicas que podem dar suporte para os programas de melhoramento, em que tais conhecimentos podem auxiliar e elucidar as respostas da espécie em ambientes que sofrem com condições de salinização dos solos, por exemplo.

Os SnRKs são uma família de genes que respondem a tolerância à estresses abióticos, em especial o estresse salino. Neste trabalho foram identificados 53 genes pertencentes a essa família, sendo distribuídos como: 2 pertencentes a subfamília SnRK1, 38 a subfamília SnRk2 e 13 para a subfamília SnRK3, os quais foram caracterizados filogeneticamente além de sua estrutura gênica e presença de motivos conservados.

Estudos de expressão gênica realizados com essa família de genes identificados em duas cultivares brasileiras, mostraram que existe expressão diferencial nos diferentes tecidos para as duas cultivares; sendo possível ainda identificar que a cultivar Paluma possui expressão maior de genes pertencentes a subfamília SnRK2, e cultivar Cortibel RM dos genes da subfamília SnRK3, evidenciando que existem diferentes respostas ligadas a cada cultivar.

Para estudos de estresses em plantas que podem trazer respostas sobre a expressão de diferentes genes ligados a tolerância, é necessária uma padronização de experimento, que tem como finalidade diminuir o máximo possível de variações que podem influenciar negativamente nas análises ajustadas. Neste trabalho, foi possível visualizar que o sistema de hidroponia se mostrou satisfatório para a realização do mesmo, porém para maior eficiência é necessário aquisição de mudas no mesmo estágio de desenvolvimento haja visto que principalmente o crescimento das raízes pode influenciar diretamente na tolerância à salinidade

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os dados apresentados neste estudo é possível ampliar ainda mais os estudos a respeito da tolerância para o estresse salino em *P. guajava*, que podem permitir a validação funcional dos genes SnRKs com trabalhos que podem compreender o papel dessa família gênica em relação a tolerância à estresse abiótico na espécie.

Novos experimentos em casa de vegetação de estresse salino estão em fase de preparação; serão selecionadas mudas de propagação vegetativa das diferentes cultivares no mesmo estágio de desenvolvimento, afim de reduzir possíveis interferentes nas respostas ao estresse como foi relatado.

Outros estudos estão sendo realizados concomitantemente para que seja possível a realização de análises de expressão gênica via RTqPCR. A normalização de genes referência, que possibilita a realização dos mesmos, também são desenvolvidos em fase de finalização.

Os conhecimentos gerados neste trabalho podem ainda auxiliar na busca e caracterização de novas famílias de genes que também respondem ao estresse salino, permitindo ampliar cada vez mais os conhecimentos das respostas a tolerância em *P.guajava*, gerando subsídios importantes para os programas de melhoramento da mesma.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL QADOS, A. M. S. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 10, p. 7–15, 2011.

ALBRECHT, V. et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. **EMBO Journal**, v. 20, n. 5, p. 1051–1063, 2001.

ARZANI, A.; ASHRAF, M. Critical Reviews in Plant Sciences Smart Engineering of Genetic Resources for Enhanced Salinity Tolerance in Crop Plants Smart Engineering of Genetic Resources for Enhanced Salinity Tolerance in Crop Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 0, p. 1–44, 2016.

BAENA-GONZÁLEZ, E.; SHEEN, J. Convergent energy and stress signaling. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 9, p. 474–482, 2008.

BEHNAM, B. et al. An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (*Manihot esculenta* Crantz). **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 814–825, 2019.

BOHNERT, H. J. et al. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - Getting genomics going. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 180–188, 2006.

BONTEMPO, P. et al. *Psidium guajava* L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 1, p. 22–31, fev. 2012.

BOUDSOCQ, M.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIÈRE, C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41758–41766, 2004.

BOUDSOCQ, M.; LAURIÈRE, C. Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1185–1194, 2005.

CAKMAK, T. et al. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947–1957, 2012.

CANAL, D. The draft genome assembly of *Psidium guajava* L. p. 47, 2018.

CHAND, U. et al. Salinity stress response and ‘ omics ’ approaches for improving salinity stress tolerance in major grain legumes. **Plant Cell Reports**, v. 38, n. 3, p. 255–277, 2019.

CHEN, X. et al. Genome-Wide Analysis of Soybean HD-Zip Gene Family and Expression Profiling under Salinity and Drought Treatments. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–17, 2014.

CHOI, J. H. et al. Inhibitory effect of *Psidium guajava* water extract in the development

- of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2923–2929, 2012.
- CHUNG, B. Y. W. et al. Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1–13, 2006.
- COELLO, P.; HEY, S. J.; HALFORD, N. G. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: Potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 883–893, 2011.
- COLINA, F. et al. Genome-wide identification and characterization of CKIN/SnRK gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.
- COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Botânica e variedades. **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: Incaper, p. 27–56, 2003.
- DALVI, N. B. C. **QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE GENÓTIPOS DE GOIABA SOB ESTRESSE SALINO E CORRELAÇÕES ENTRE CARACTERES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-SEMINAL**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2012.
- DEINLEIN, U. et al. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science**, p. 1–9, 2014.
- DEROSE-WILSON, L.; GAUT, B. S. Mapping Salinity Tolerance during *Arabidopsis thaliana* Germination and Seedling Growth. **PLOS ONE**, v. 6, p. 1–12, 2011.
- DUTTA, S.; DAS, S. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 5, p. 313, 2010.
- EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L. Avaliação da Qualidade de Polpa de Goiaba Congelada, Comercializada na Cidade de São Paulo Quality Evaluation of Frozen Guava Pulp Commercialized in the City of São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 76–81, 2006.
- FENG, C. et al. A chromosome-level genome assembly provides insights into ascorbic acid accumulation and fruit softening in guava (*Psidium guajava*). **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–14, 2020.
- FENG, J. et al. TaSnRK2.9, a sucrose non-fermenting 1-related protein kinase gene, positively regulates plant response to drought and salt stress in transgenic tobacco. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. January, p. 1–17, 2019.
- FERNANDES, M. **GuavaDB: O BANCO DE DADOS DA GENÔMICA DE *Psidium guajava* L.** [s.l.: s.n.].
- FERREIRA, R. G.; TÁVORA, F. J. A. F.; HERNANDEZ, F. F. F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 79–88, 2001.

- FUJII, H.; VERSLUES, P. E.; ZHU, J. K. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 4, p. 1717–1722, 2011.
- GALILI, T. et al. Heatmaply: An R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, v. 34, n. 9, p. 1600–1602, 2018.
- GUZMAN, F. et al. De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. **Plant Science**, v. 229, p. 238–246, 2014.
- HALFORD, N. G. et al. Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 35–42, 2004.
- HALFORD, N. G.; HEY, S. J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. **Biochemical Journal**, v. 419, n. 2, p. 247–259, 2009.
- HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 774–785, 2007.
- HARDIE, D. G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 821–855, 1998.
- HRABAK, E. M. et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 666–680, 2003.
- HUAI, J. et al. Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 12, p. 1861–1868, 2008.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 225–236, 1995.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=conceitos-e-metodos>>.
- JEFFARES, D. C.; PENKETT, C. J.; BÄHLER, J. Rapidly regulated genes are intron poor. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 8, p. 375–378, 2008.
- KOBAYASHI, Y. et al. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. **Plant Cell**, v. 16, n. 5, p. 1163–1177, 2004.
- KULIK, A. et al. SnRK2 protein Kinases - Key regulators of plant response to abiotic stresses. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 15, n. 12, p. 859–872, 2011.
- LEE, J.-D. et al. Inheritance of Salt Tolerance in Wild Soybean (*Glycine soja* Sieb. and

- Zucc .) Accession PI483463. **Journal of Heredity**, v. 100, p. 798–801, 2009.
- LI, G. et al. Cloning and characterization of a SnRK1-encoding gene from *Malus hupehensis* Rehd. and heterologous expression in tomato. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 2, p. 947–954, 2010.
- LIAO, H. et al. GmPAP3 , a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. **Gene**, v. 318, p. 103–111, 2003.
- LINS, T. H. et al. Evaluation of antimicrobial activity of psidium guajava species. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. P79, out. 2014.
- LIU, Y.; ZHOU, J.; WHITE, K. P. RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication? **Bioinformatics**, v. 30, n. 3, p. 301–304, 2014.
- LORENZO, L. DE et al. Differential Expression of the TFIIIA Regulatory Pathway in Response to Salt Stress between. **Plant Physiology**, v. 145, p. 1521–1532, 2007.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.
- MANI, A.; MISHRA, R.; THOMAS, G. Elucidation of Diversity among Psidium Species using Morphological and SPAR methods. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 8, p. 53–61, 2011.
- MEHER et al. Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 285–289, 2018.
- MERCHAN, F. et al. Identification of regulatory pathways involved in the reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, v. 51, p. 1–17, 2007.
- MITTAL, A. et al. RNA-sequencing based gene expression landscape of guava cv. Allahabad Safeda and comparative analysis to colored cultivars. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2020.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.
- NASEER, S. et al. The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). **Clinical Phytoscience**, v. 4, n. 1, p. 32, dez. 2018.
- NEGRÃO, S.; SCHMOCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119, p. 1–11, 2017.
- NUKARINEN, E. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–19, 2016.
- OHTA, M. et al. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with

the protein phosphatase 2C ABI2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11771–11776, 30 set. 2003.

OPEL, K. L.; CHUNG, D.; MCCORD, B. R. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 1, p. 25–33, 2010.

PENA, A. T. C. **RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FRUTOS DE GOIABEIRA E RELAÇÃO COM ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA FRUTA**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2017.

PURCELL, P. C.; SMITH, A. M.; HALFORD, N. G. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. **Plant Journal**, v. 14, n. 2, p. 195–202, 1998.

RAMON, M. et al. Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development. **Plant Cell**, v. 31, n. 7, p. 1614–1632, 2019.

ROBAGLIA, C.; THOMAS, M.; MEYER, C. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 301–307, 2012.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37–45, 1992.

SANCHEZ, D. H. et al. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. **The Plant Journal**, v. 53, p. 973–987, 2008.

SILVA, S. N. DA. **Diversidade de genótipos de goiabeiras por caracteres vegetativos e reprodutivos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO, 2017.

SONG, Y. et al. The Dynamic Changes of DNA Methylation and Histone Modifications of Salt Responsive Transcription Factor Genes in Soybean. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–11, 2012.

SOUSA, L. L. **MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E GENÔMICA EM ESPÉCIES DE *Psidium***. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO –, 2019.

TELLA, T.; MASOLA, B.; MUKARATIRWA, S. The effect of *Psidium guajava* aqueous leaf extract on liver glycogen enzymes, hormone sensitive lipase and serum lipid profile in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2441–2446, jan. 2019.

THRIMAWITHANA, A. H. et al. A whole genome assembly of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) for mānuka research. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 47, n. 4, p. 233–260, 2019.

TULER, A. C. et al. Diversification and geographical distribution of *Psidium* (

Myrtaceae) species with distinct ploidy levels. **Trees**, v. 33, n. 4, p. 1101–1110, 2019.

UMEZAWA, T. et al. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17306–17311, 2004.

VITTI, K. A.; DE LIMA, L. M.; FILHO, J. G. M. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 1, p. 1–11, 2020.

WANG, X. et al. Expression of a heterologous SnRK1 in tomato increases carbon assimilation, nitrogen uptake and modifies fruit development. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 12, p. 1173–1182, 2012.

WANG, Y. et al. Comprehensive analysis of SNRK gene family and their responses to salt stress in *eucalyptus grandis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1–21, 2019a.

WANG, Y. et al. Comprehensive Analysis of SnRK Gene Family and their Responses to Salt Stress in *Eucalyptus grandis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, p. 1–21, 2019b.

WATANABE, H. S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. **Cultura da goiaba: Do plantio a comercialização**, p. 133–150, 2009.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741–3751, 1997.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S165–S183, maio 2002.

YAN, H. et al. Genome-Wide Characterization , Evolution , and Expression Profiling of VQ Gene Family in Response to Phytohormone Treatments and Abiotic Stress in *Eucalyptus grandis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–16, 2019.

ZAHAFI, O. et al. Comparative Transcriptomic Analysis of Salt Adaptation in Roots of Contrasting *Medicago truncatula* Genotypes. **Molecular Plant**, v. 5, p. 1–14, 2012.

ZHANG, H. et al. Overexpression of a common wheat gene *TasnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 2–13, 2010.

ZHANG, H. et al. Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) *TaSnRK2.7* gene involved in abiotic stress responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 975–988, 2011.

ZHAO, S. et al. Plant Physiology and Biochemistry Genome-wide analysis of the YABBY family in soybean and functional identification of *GmYABBY10* involvement in high salt and drought stresses. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 119, p. 132–146, 2017a.

- ZHAO, W. et al. Genome-wide identification and characterization of the GmSnRK2 family in soybean. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017b.
- ZHU, J. SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. **Annual Reviews of Plant**, v. 53, p. 247–273, 2002.
- ZHU, W. et al. Genome-wide identification and characterization of SnRK family genes in *Brassica napus*. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 2020.
- ALTMAN, A.; MENDEL, K.. Characteristics of the Uptake Mechanism of Chloride Ions in Excised Roots of a Woody Plant (Citrus). **Physiologia Plantarum**. Wiley, v. 29, n. 2, p. 157-162, 1973.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v.166, n.1, p.3-16, 2004.
- BEN AMOR, N.; BEN HAMED, K.; DEBEZA, A.; GRIGNONB, C.; ABDELLEY, C. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. **Plant Science**, v.168, p.889-899, 2005
- CAVALCANTE, L. F.; CORDEIRO, J. C.; NASCIMENTO, J. A. M.; CAVALCANTE, I. H. L.; DIAS, T. J. Fontes e níveis da salinidade da água na formação de mudas de mamoeiro cv. Sunrise solo. **Ciências Agrárias**, v.31, p.1281-1290, 2010.
- CHAND, U. et al. Salinity stress response and ‘ omics ’ approaches for improving salinity stress tolerance in major grain legumes. **Plant Cell Reports**, v. 38, n. 3, p. 255–277, 2019.
- CHANDRU, H.K.; KIM, E.; KUK, Y.; CHO, K.; HAN, O. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. **Plant Science**, v.164, p.935-941, 2003
- COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Botânica e variedades. **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: Incaper, p. 27–56, 2003.
- D’ALMEIDA, D. M. B. A. D.; ANDRADE, E. M.; MEIRELES, A. C. M.; NESS, R. L. L. Importância relativa dos íons na salinidade de um Cambissolo na Chapada do Apodi, **Engenharia Agrícola**, v.25, n.3, p.615- 621, 2005
- DALVI, N. B. C. Qualidade fisiológica de sementes de genótipos de goiaba sob estresse salino e correlações entre caracteres do desenvolvimento pós-seminal. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2012.
- EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L. Avaliação da Qualidade de Polpa de Goiaba Congelada , Comercializada na Cidade de São Paulo Quality Evaluation of Frozen Guava Pulp Commercialized in the City of São Paulo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 76–81, 2006.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v.28, p.1056-1071, 2005.

GHAFOOR, A.; QADIR, M.; MURTAZA, G. **Salt Affected Soils: Principle of Management** (1st Ed.) Institute of Soil and Environmental Sciences, Uni. Agric. Faisalabad. 2004.

IBGE. Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=conceitos-e-metodos>>.

MANI, A.; MISHRA, R.; THOMAS, G. Elucidation of Diversity among Psidium Species using Morphological and SPAR methods. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 8, p. 53–61, 2011.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants.2.ed. London: **Academic**, 889 p. 1995.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

MORTON, J. F.; DOWLING, C. F. Fruits of warm climates. [s.l.] **JF Morton Miami, FL**, 1987. v. 20534

MUNNS, R.; SHARP, R.E. Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 425-437, 1993

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; HESHEL, A. Ecophysiology of Pennisetum clandestinum: a valuable salt tolerant grass. **Environmental and Experimental Botany**, v.92, p.55–63, 2013.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; SANTONOCETO, C.; ANASTASI, U.; PREITI, G. Response of four genotypes of lentil to salt stress conditions. **Seed Science and Technology**, v.35, p.497–503, 2007.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v,60. p,324–349, 2005.

QADIR, M.; OSTER, J. D. Crop and irrigation management strategies for saline-sodic soils and waters aimed at environmentally sustainable agriculture. **Science of the total Environment**, v.323, n.1-3, p.1-19. 2004.

RENGEL, Z. The role of calcium in salt toxicity. **Plant Cell Environment**, v. 15, p. 625-632, 1992.

RIBEIRO, M. R. Origem e Classificação dos Solos Afetados por Sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados**. Fortaleza, INCTSal. p.11-19. 2010.

RIBEIRO, M. R.; BARROS, M. F. C.; FREIRE, M. B. G. S. **Química dos solos salinos e sódicos**. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. (ed) In: Química e mineralogia do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v.2., cap.19, p.449- 484, 2009.

SANDA, K. A. et al. Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 316–324, 2011.

SILVA, E. M. da. **Tolerância de Porta-enxerto de Goiabeira à Salinidade da Água de Irrigação sob Abubação Nitrogenada**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Horticultura Tropical, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal – Pb, 2015.

STOREY, R. Salt Tolerance, Ion Relations and the Effect of Root Medium on the Response of Citrus to Salinity. **Functional Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 101-114, 1995.

STOREY, R; WALKER, R.R. Citrus and salinity. **Scientia Horticulturae**. Elsevier BV, v. 78, n. 1-4, p. 39-81, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p.

WANG, Y. et al. Comprehensive Analysis of SnRK Gene Family and their Responses to Salt Stress in *Eucalyptus grandis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, p. 1–21, 2019.

WATANABE, H. S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. **Cultura da goiaba: Do plantio a comercialização**, p. 133–150, 2009.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R.; BOGET, N.; SANTOS, M.; TORNÉ, J.M. Polyamines and free amino acid variation in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, p. 179185, 1996.

ZHU, J. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Reviews of Plant**, v. 53, p. 247–273, 2002.

9.APÊNDICE

Apêndice 1: Tabela de motivos de aminoácidos conservados e anotação de PgSnRKs: A tabela mostra a número dos motivos conservados identificados após análise MEME, com tamanhos de aminoácidos para cada motivo e anotação funcional obtidos no banco de dados Pfam.

Motivo	Tamanho	Anotação
1	200	Protein Kinase
2	122	Protein Kinase
3	22	-
4	21	-
5	24	Protein Kinase
6	29	-
7	30	-
8	29	-
9	15	-
10	20	-
11	41	-
12	41	-
13	29	-
14	23	Protein NAF
15	83	-
16	30	Protein NAF
17	91	-
18	32	-
19	11	-
20	54	Protein Kinase

Apêndice 2: Sequencias de aminoácidos dos domínios conservados identificados após análise MEME.

Motivo - 1

IRFKEVILTPHTLAIVMEYAAGGELFERICNAGRSEDEARYFFQQLISGVSYCHSMQI
 CHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSLLHSRPKSTVGTPAYIAPEVLSRKEYDG
 KJADVWSCGVTLVMLVGAYPFEDPEDPKNFRKTIQRIMAVQYSIPDYVHISQDCRHL
 LSRIFVANPSRRITIPKSHPF

Motivo - 2

YFQQLIBAVDYCHSRGVYHRDLKPENLLLDENGNLKVSDFGLSALPZQVRDDGLLHTTC
 GTPNYVAPEVJNNGYDGAKADIWSCGVILFVLLAGYLPFDDANLMELYRKIFKAEFKC
 PSWF

Motivo - 3

DVWSCGVILYELLAGKPPFPGR

Motivo - 4

EKIDEQVAREISIMRLLRHPN

Motivo - 5

QQJJSGLYCHSNGVVHRDJKPEN

Motivo - 6

GKTJGEGTFGKVYLARBKETGEJVAIKVI

Motivo - 7

IVRLYEVMATKTKIYIVMEYVKGGELFDKI

Motivo - 8

LISRJLDPBPSKRITAAEILEHPWFKKNY

Motivo - 9

VGTPWYMAPEVLLGK

Motivo - 10

LLLDNNGNLKJADFGLA AFL

Motivo - 11

RKGQLAVAAEVFEVAPSLFVVELRKSAGDTLEYKKFCKSLS

Motivo - 12

JVTSRMSGSLYLVEFEYMEHDLAGLIARPGJKFSEPQVKCYM

Motivo - 13

EVEQLHKIFKLCGSPSEDYWKVKLPHAT

Motivo - 14

PLSMNAFZLISLSQGLBLSGLFE

Motivo - 15

EAEPGLDKSFGFSKNFGARYELGEEVGRGHFGYTCWAKAKKGELKGQQVAVKVI PKAKM

TTAIAIEDVRREVKILRALTG HKN

Motivo - 16

KRETRFTSKHPASVIJSKJEEVAKRLGLKV

Motivo - 17

NGYISLENFKVALMKNATDAMKESRVPDFLDVLSLQYKKMDFEFCAA AISVHQLEAR

DDWEQJARKAFEJFEKEGNRP IVIDELASELG

Motivo - 18

EGEAYNQKEEPDQPLQSV E EIMKII ZEARTPA

Motivo - 19

KGKLRDEARK

Motivo - 20

SPIQAAFVAVVQKNLRPPJPKDCPPALAHJIQKCWSENPEKRPEFDZIVRMLEQF

Apêndice 3: Eficiência de primer: Para a análise de eficiência do primer Histona H2A, foi construída curva padrão com quantidades de cDNA de 50 ng (mais alta), 25 ng, 2,5 ng, 0,25 ng e 0,025 ng (mais baixa). A eficiência foi de 98%.

